

**Analyse zirkulierender Tumorzellen bei
Brustkrebspatientinnen unter Erhaltungstherapie mit
Tamoxifen und bei der Therapieumstellung auf
Aromatasehemmer**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae

(Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Susanne Edler

geboren am 10.02.1985 in Wurzen

Gutachter:

1. Frau PD Dr. med. K. Pachmann
2. Herr Prof. Dr. med. I. Runnebaum
3. Herr PD. Dr. med. habil. O. Kamara

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.01.2015

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Abkürzungsverzeichnis | IV |
| | |
| 1 Zusammenfassung | 1 |
| 2 Einleitung | 3 |
| 2.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms | 3 |
| 2.2 Prognose- und Prädiktionsfaktoren des invasiven Mammakarzinoms | 4 |
| 2.3 Detektion zirkulierender Tumorzellen | 7 |
| 2.4 EpCAM als Marker zirkulierender Tumorzellen | 10 |
| 2.5 Endokrine Therapie | 12 |
| 3 Zielstellung | 19 |
| 4 Material und Methoden | 20 |
| 4.1 Patientenkollektiv | 20 |
| 4.2 Material | 22 |
| 4.3 Methoden | 24 |
| 4.3.1.1 Scan [^] R-Probenaufbereitung | 25 |
| 4.3.1.2 Tumorzellanalyse mit Scan [^] R | 27 |
| 4.3.2.1 LSC-Probenaufbereitung | 29 |
| 4.3.2.2 Tumorzellanalyse mit LSC | 29 |
| 4.4 Statistische Auswertung | 31 |
| 5 Ergebnisse | 32 |
| 5.1 Hinweise zur Auswertung | 32 |
| 5.2 Tamoxifen | 34 |
| 5.2.1 Gesamtpatientenkollektiv Tamoxifen | 36 |
| 5.2.2 Tamoxifen-Monotherapie | 38 |
| 5.2.3 Verhalten der CETC unter Tamoxifentherapie vor Therapiewechsel auf einen Aromataseinhibitor und rezidivfreies Gesamtüberleben | 41 |
| 5.2.4 Verhalten der CETC unter Tamoxifentherapie vor Therapiewechsel auf einen Aromataseinhibitor und rezidivfreies Überleben unter Tamoxifen | 43 |

| | |
|---|-----------|
| 5.2.5 Therapievergleich Tamoxifen-Monotherapie vs. Tamoxifen vor switch auf einen Aromataseinhibitor | 45 |
| 5.3 Exemestan | 47 |
| 5.3.1 Gesamtpatientenkollektiv Exemestan | 48 |
| 5.3.2 Exemestan up-front | 52 |
| 5.3.3 Exemestan nach Therapiewechsel von Tamoxifen | 52 |
| 5.3.4 Exemestan nach anderer endokriner Vorthherapie..... | 54 |
| 5.4 Anastrozol..... | 55 |
| 5.4.1 Gesamtpatientenkollektiv Anastrozol | 56 |
| 5.4.2 Anastrozol up-front | 58 |
| 5.4.3 Anastrozol nach Therapiewechsel von Tamoxifen..... | 60 |
| 5.5 Letrozol | 62 |
| 5.5.1 Gesamtpatientenkollektiv Letrozol | 63 |
| 5.5.2 Letrozol up-front..... | 65 |
| 5.5.3 Letrozol nach Therapiewechsel von Tamoxifen | 67 |
| 5.6 Therapievergleich steroidale vs. nicht-steroidale Aromatasehemmer..... | 69 |
| 5.6.1 Therapievergleich | 69 |
| 5.6.2 CETC-Verläufe der reversiblen Aromatasehemmer ohne Tamoxifenvorthherapie | 70 |
| 5.6.3 CETC-Verläufe aller Aromataseinhibitoren | 72 |
| 6 Diskussion | 74 |
| 6.1 Bewertung der Methode | 74 |
| 6.2 Ergebnisdiskussion | 77 |
| 6.2.1 Ergebnisse der Tamoxifengruppe..... | 77 |
| 6.2.2 Ergebnisse der Exemestangruppe | 78 |
| 6.2.3 Ergebnisse der Anastrozolgruppe..... | 79 |
| 6.2.4 Ergebnisse der Letrozolgruppe..... | 79 |
| 6.2.5 Ergebnisse der Aromataseinhibitorgruppe | 80 |
| 6.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse | 80 |
| 7 Ausblick | 84 |
| 8 Schlussfolgerung | 86 |
| 9 Literaturverzeichnis | 87 |

| | |
|------------------------------------|-----------|
| 10 Anhang | 95 |
| 10.1 Lebenslauf..... | 95 |
| 10.2 Ehrenwörtliche Erklärung..... | 96 |
| 10.3 Abbildungsverzeichnis | 97 |
| 10.4 Tabellenverzeichnis | 99 |
| 10.5 Danksagung | 102 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|---|
| 7-AAD | 7- Aminoactinomycin D (Fluoreszenz-Farbstoff) |
| Abb. | Abbildung |
| ASCO | American Society of Clinical Oncology (Amerikanische Gesellschaft für klinische Onkologie) |
| BSA | Bovine serum albumine; Rinderserumalbumin |
| bzw. | Beziehungsweise |
| CD 45 | Cluster of Differentiation (Lymphozytenantigen) |
| CETC | Circulating epithelial tumor cells (zirkulierende epitheliale Tumorzellen) |
| CK | Cytokeratin |
| cm ² | Quadratcentimeter |
| DAPI | 4-, 6-, Diamino- 2- Phenylindol |
| DGHO | Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie |
| DNA | Desoxyribonucleinacid; Desoxyribonukleinsäure |
| DTC | Disseminated tumor cells (disseminierte Tumorzellen) |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EMT | Epithelial – to – mesenchymal – Transition |
| EpCAM | Epithelial cell adhesion molecule (epitheliales Zelladhäsionsmolekül) |
| FDA | Food and drug association, USA |
| FSH | Follikel stimulierendes Hormon |
| G | Grading (histopathologische Gradeinteilung eines Tumors) |
| GA | Genetischer Algorithmus |
| GEKID | Gesellschaft für epidemiologische Krebsregister in Deutschland |
| GnRH | Gonadoliberin; Gonadotropin-Releasing-Hormon |
| h | Stunde(n) |
| HER (2/neu) | Human epithelial growth factor (2); humaner epithelialer Wachstumsfaktor |
| kDa | Kilo-Dalton |
| Ki-67/MIB-1 | Ki-67-Antigen zur Identifikation sich teilender menschlicher Zellen (Proliferationsmarker), MIB-1 ist ein monoklonaler Antikörper gegen Ki-67 |
| LSC | Laser Scanning Cytometer |
| M | Metastasenstadium eines Tumors |
| µl | Mikroliter |
| min | Minute(n) |
| ml | Mililiter |
| mRNA | messenger Ribonucleid-Acid (Boten-Ribonukleinsäure) |

| | |
|------|--|
| N | Lymphknotenstadium eines Tumors |
| PAI | Plasminogen-Aktivator-Inhibitor |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion) |
| pT | Histopathologisch bewertetes Tumorstadium |
| RKI | Robert – Koch – Institut |
| SERM | Selektiver Östrogen-Rezeptor-Modulator |
| T | Tumorgröße |
| Tab. | Tabelle |
| U | Unit |
| uPA | Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ |
| USA | United States of America (Vereinigte Staaten von Amerika) |
| vs. | Versus |
| WHO | World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation) |
| z.B. | zum Beispiel |

1 Zusammenfassung

Die Krankheitsentität des Mammakarzinoms stellt die häufigste onkologische Erkrankung der Frau dar. Die Möglichkeit, die zirkulierenden Tumorzellen für eine an die Patientin angepasste, individualisierte Therapie zu nutzen, stellt die Grundlage dieser Arbeit dar.

Anhand der bereits etablierten MAINTRAC® - Methode zur Bestimmung zirkulierender epithelialer Tumorzellen wurden diese von über 100 Brustkrebspatientinnen über einen Zeitraum von über 10 Jahren bestimmt und ausgewertet. In die Studie wurden über 100 postmenopausale Patientinnen eingeschlossen, die an einem nicht primär metastasierten Mammakarzinom litten. Betrachtet wurde die Kinetik zirkulierender epithelialer Tumorzellen unter bestimmten Therapieregimen und ob es während dieses Zeitraumes zu einem Rezidiv kam. Die Analyse erfolgte unter Zuhilfenahme des Scan[^]R – Gerätes bzw. mittels Laser Scanning Cytometrie (LSC) unter standardisierten Bedingungen. Die Daten wurden anschließend in Excel-Tabellen festgehalten. Die Auswertung erfolgte letztlich anhand von Kaplan – Meier – Überlebenskurven.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten bestätigen, dass zirkulierende epitheliale Tumorzellen bezüglich ihrer Kinetik Prognoseabschätzungen zum weiteren Krankheitsverlauf von nicht primär metastasierten postmenopausalen Brustkrebspatientinnen, welche eine Tamoxifenmonotherapie erhielten, liefern. Dies konnte nun erstmals über einen Beobachtungszeitraum von mehr als zehn Jahren erfolgen. Weiterhin wurde das Verhalten zirkulierender epithelialer Tumorzellen nach Therapiewechsel von Tamoxifen auf einen der gängigen Aromatasehemmer betrachtet. Hierbei war auffällig, dass in der Anastrozol – und Exemestan – Gruppe ein Trend beobachtet werden konnte. Dies bedeutet, dass tendenziell eine Prognoseabschätzung bezüglich des Krankheitsverlaufs postmenopausaler Brustkrebspatientinnen möglich ist. In der Gruppe derjenigen Patientinnen, bei denen ein Therapiewechsel von Tamoxifen zu Letrozol erfolgte, war dies mit einem Signifikanzniveau von $p=0,002$ statistisch signifikant. Die jeweiligen Gruppen wurden im Lauf der Arbeit weiter aufgeschlüsselt und es konnte immer wieder gezeigt werden, dass die CETC-Kinetik mit dem Rezidivverhalten unter den jeweiligen endokrinen Therapieoptionen korreliert. Die Ergebnisse waren, aufgrund der Gruppeneinteilung, oft nur in sehr kleinen Kollektiven aufzuzeigen, weshalb es in der Zukunft sicherlich nützlich sein wird, diese Ergebnisse anhand größerer Patientenkollektive zu verifizieren.

Letztendlich war es möglich, die zirkulierenden Tumorzellen als unabhängigen Prognosefaktor bezüglich des Rezidivverhaltens beim Mammakarzinom darzustellen. Sie sollten somit in der Zukunft als ein Kriterium bei der Entscheidung des Therapieverhaltens mit einfließen, um der postmenopausalen Mammakarzinom - Patientin unnötige Therapien und deren nicht unleugbaren Nebenwirkungen zu ersparen.

2 Einleitung

2.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Brustkrebs ist weltweit mit über 1,3 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr und einem Anteil von etwa 23% an allen Krebsneuerkrankungen der Frau die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau und zudem die zweithäufigste Krebserkrankung insgesamt (Ferlay et al. 2010).

Jährlich sterben weltweit mehr als 450.000 Frauen am Mammakarzinom und mit einem Anteil von 13,7% an allen malignombedingten Sterbefällen ist Brustkrebs gleichzeitig die häufigste Krebstodesursache (Ferlay et al. 2010).

In Deutschland ist bisher lediglich eine Schätzung der Krebsinzidenzen möglich, da bisher keine bundesweite und vollständige Krebsregistrierung existiert (Kreienberg et al. 2010).

Mit einem geschätzten Anteil von 32,1% aller Tumoren der Frau ist der Brustkrebs auch in Deutschland die häufigste Krebsneuerkrankung des weiblichen Geschlechts (RKI 2012).

Die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (GEKID 2013, RKI 2012) prognostiziert für das Jahr 2012 rund 74.500 Brustkrebsneuerkrankungen deutschlandweit.

Das Robert-Koch-Institut (RKI 2012) hat bisher nur Schätzungen für das Jahr 2008 veröffentlicht und gibt rund 72.000 Neuerkrankungsfälle an invasivem Brustkrebs an. Somit erkrankt etwa eine von acht Frauen an diesem Malignom (RKI, GEKID 2012).

In Thüringen wird von der GEKID die Zahl der Neuerkrankungen im Jahr 2009 auf 1.857 Fälle geschätzt.

Tendenziell wird in Deutschland seit 1980 eine stetige Zunahme der Inzidenz der Brustkrebserkrankung bis in das Jahr 2000 hinein festgestellt (RKI 2012). Die altersstandardisierte Inzidenz ist in dieser Zeit um 50% gestiegen, die absolute Inzidenz stieg sogar um mehr als 65% (RKI 2012).

Auch für das Jahr 2006 geht man von einer leichten Zunahme der Brustkrebsneuerkrankungen im Vergleich zu den Vorjahren aus (Kreienberg et al. 2010). Dies ist aber nicht unbedingt auf eine tatsächliche Zunahme der Erkrankungshäufigkeit zurückzuführen, sondern vielmehr auf die bessere Detektion der Karzinome durch die Einführung des Mammographie-Screenings (RKI 2012) und der zunehmenden Zahl an bevölkerungsbezogenen Krebsregistern, die in die Schätzung eingingen (Kreienberg et al. 2010).

In den USA hingegen wird ein Rückgang der Brustkrebsinzidenz beobachtet, der hypothetisch auf der selteneren Verschreibung von Hormonersatztherapeutika beruhen könnte (Chlebowski 2008; Kreienberg et al. 2010).

Mit einem Anteil von 17,6% ist die Mortalität von Brustkrebs an allen tumorbedingten Todesfällen die häufigste Krebstodesursache nicht nur weltweit, sondern auch in Deutschland (Kreienberg et al. 2010).

Im Jahr 2010 wurden von der GEKID 17.466 Brustkrebstodesfälle deutschlandweit registriert. Für Thüringen wurden im selben Jahr 414 brustkrebsbedingte Todesfälle erfasst (GEKID 2012).

Sowohl in den USA als auch in Deutschland wird ein Rückgang der Mortalität der Brustkrebserkrankung beobachtet. Die Zahl der absoluten Todesfälle blieb hingegen relativ konstant (RKI 2012).

Dies wird einerseits mit dem früheren Erkennen der Erkrankung durch Screening-Programme und andererseits mit dem Einsatz besser etablierter Therapieprinzipien in Zusammenhang gebracht (RKI 2012).

Die relative 5-Jahresüberlebensrate der Diagnosejahrgänge 2000 bis 2004 lag bei 81% (RKI 2012). Neuere Jahrgänge geben relative 5-Jahresüberlebensraten von 83% bis 87% an (RKI 2012).

2.2 Prognose- und Prädiktionsfaktoren des invasiven Mammakarzinoms

Die Bestimmung von Prognose- und Prädiktionsfaktoren bildet die Grundlage bei der Therapieplanung. Mithilfe der Prognosefaktoren soll der Krankheitsverlauf antizipiert werden und das Risiko für Rezidive oder Metastasen abgeschätzt werden. Ziel ist es, sowohl eine Untertherapie bei vermeintlich aggressiven Tumoren, als auch eine Übertherapie bei ohnehin prognostisch günstigen Tumoren zu vermeiden. Andererseits soll durch Bestimmung von prädiktiven Faktoren das Ansprechen auf bestimmte Therapieformen vorhergesagt werden (Böcker et al. 2008a; Janni 2007; Kreienberg et al. 2010).

Als erster wichtiger Prognosefaktor sei die Tumorgöße genannt: diese korreliert sowohl mit dem Vorhandensein axillärer Lymphknoten, als auch mit der Anzahl befallener Lymphknoten (Carter et al. 1989; Cianfrocca et al. 2004). Weiterhin ist anzumerken, dass mit steigender

Tumorgröße auch das Metastasierungs- bzw. Rezidivrisiko ansteigen (Carter et al. 1989; Koscielny et al. 1984; Rosen et al. 1993). Man geht davon aus, dass bei einer Tumorgröße von über 2cm das Rezidivrisiko um 20% zunimmt.

Der prognostische Faktor mit der höchsten Aussagekraft ist der axilläre Lymphknotenstatus (Cianfrocca & Goldstein 2004; Kreienberg et al. 2010). Es ist davon auszugehen, dass mit der Anzahl der tumorpositiven Lymphknoten sowohl das Rezidiv- als auch Metastasierungsrisiko ansteigt (Cianfrocca & Goldstein 2004; Clark et al. 1988; Nemoto et al. 1983; Saez et al. 1989). Des Weiteren sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate mit der zunehmenden Zahl befallener Lymphknoten (Fisher et al. 1983). Da, wie oben erwähnt, der positive Nodalstatus der wichtigste prognostische Faktor ist, ist es bei nodal-negativen Patientinnen relativ schwierig eine Abschätzung des Krankheitsverlaufes zu gewährleisten (Cianfrocca & Goldstein 2004; Kreienberg et al. 2010).

Prognosefaktoren, die in diesem Falle, neben der Tumorgröße, zu Rate gezogen werden können, sind tumormorphologische Faktoren wie z.B. das Grading oder der histologische Tumortyp. Bestimmte histologische Subtypen sind mit einer guten Prognose assoziiert, wie beispielsweise das tubuläre, das medulläre oder das muzinöse Mammakarzinom. Andere histologische Subtypen sind hingegen mit einer schlechten Prognose assoziiert, wie z.B. das inflammatorische Mammakarzinom (Bühling et al. 2004; Carstens et al. 1985; Ridolfi et al. 1977). Um diese Subtypen valide einteilen zu können, sollen bestimmte Graduierungssysteme, wie z.B. das nukleäre Grading nach Elston und Ellis und die Scarff-Bloom-Richardson-Klassifikation helfen (BLOOM et al. 1957). Letztere bezieht Mitoseindex, Differenzierung und Pleomorphismus ein, jedes Kriterium wird mit 1-3 Punkten bewertet, woraus anschließend die Summe gebildet wird. Anhand dieses Zahlenwertes kann schließlich die Prognose abgeschätzt werden. Dadurch ist eine grobe Abschätzung der 5-Jahres-Überlebensrate möglich (Cianfrocca & Goldstein 2004).

Erwähnenswert ist ebenfalls die Lymphgefäßinfiltration, welche mit einem erhöhten Rezidivrisiko und einer höheren Mortalität (Rosen et al. 1989) sowie mit einem um 15% gesteigerten 5-Jahres-Rezidivrisiko in Zusammenhang steht (Neville et al. 1992).

Alter und Menopausenstatus dienen ebenfalls der Abschätzung der Prognose. Prämenopausale Frauen haben ein deutlich häufigeres Auftreten von G3-Tumoren, höhere Proliferationsraten, einen vermehrten Lymphknotenbefall, exprimieren seltener

Hormonrezeptoren und haben ungünstigere tumorbiologische Eigenschaften; sind also insgesamt mit einer schlechteren Prognose behaftet (Kreienberg et al. 2010). Jedoch zeigt die adjuvante Chemotherapie bei Frauen unter dem 40. Lebensjahr eine bessere Wirksamkeit (Bodmer et al. 2011; Goldhirsch et al. 2009). Grundsätzlich sei noch anzumerken, dass sowohl Alter als auch Menopausenstatus nicht prädiktiv für das Ansprechen auf eine Tamoxifentherapie sind. Allein der Hormonrezeptorstatus bietet hierzu eine Aussagekraft.

Dieser gilt als weiterer Faktor, welcher vor allem für die Art der Therapie entscheidend ist. Er stellt nämlich den wichtigsten prädiktiven Faktor für die Wirksamkeit einer endokrinen Therapie dar (EBCTCG 2005). Dabei werden der Östrogen- und der Progesteronstatus untersucht. Bei einem positiven Hormonrezeptorstatus geht man von einem längeren Gesamtüberleben aus (Kreienberg et al. 2010). Vor allem in den ersten drei Jahren haben hormonrezeptorpositive Patientinnen eine bessere Prognose, welche in den nachfolgenden Jahren allerdings nicht mehr nachweisbar ist (Hilsenbeck et al. 1998). Der positive Hormonrezeptorstatus scheint für einen langsam wachsenden Tumortyp zu stehen, der erst spät rezidiert (Cianfrocca & Goldstein 2004).

Ein weiterer Prognose- bzw. Prädiktionsfaktor ist der HER2/neu-Status. HER2/neu ist ein Protoonkogen, welches auf dem langen Arm von Chromosom 17 lokalisiert ist und für die Expression eines transmembranen Glykoproteins mit intrinsischer Kinaseaktivität, den HER2-Rezeptor, verantwortlich ist (Schechter et al. 1984). Das HER2/neu-Gen bzw. der HER-Rezeptor wird in nahezu 30% der Mammakarzinome amplifiziert oder überexprimiert (Slamon et al. 1987). Eine Überexpression ist mit einer gesteigerten Tumoraggressivität, erhöhten Rezidivraten und einer gesteigerten Mortalität sowohl bei nodal-positiven als auch bei nodal-negativen Patientinnen assoziiert (Cianfrocca & Goldstein 2004; Ross et al. 2009). Ein positiver HER2/neu-Status geht grundsätzlich mit einem schlechteren Ansprechen auf die endokrine Therapie einher, wohingegen diese Tumoren besser auf anthrazyklin- und taxanhaltige Chemotherapeutika ansprechen als auf das früher häufig verwendete Cyclophosphamid-Methotrexat-5-Floururacil-Chemotherapie-Regime. Logisch erscheint des Weiteren, dass eine Therapie mit Anti-HER2-Substanzen nur bei positivem HER2/neu Status möglich ist (Kreienberg et al. 2010).

Nicht nur der Hormonrezeptorstatus, sondern auch der Nachweis von Proliferations- und Metastasierungsmarkern, spielen neuerdings bei der Abschätzung der Prognose und des Therapieansprechens eine Rolle. Grundsätzlich geht eine hohe Proliferationsrate (Nachweis von Ki67/MIB-1) mit einem guten Ansprechen auf eine adjuvante Chemotherapie einher. Der immunhistochemische Nachweis des proliferationsassoziierten Antigens Ki-67/MIB-1 zur Prognose- bzw. Therapieabschätzung befindet sich derzeit jedoch aufgrund der Frage nach dem Schwellenwert in der Diskussion. Derzeit liegt der allgemein anerkannte Schwellenwert bei 14% (Bodmer & Castiglione 2011). Bei Erreichen bzw. Überschreiten dieses Wertes ist von einer erhöhten Proliferation mit den oben genannten Folgen auszugehen. Auch bei den Metastasierungsmarkern uPA und PAI-1 geht man bei hohen Serumspiegeln von einer guten Wirksamkeit der Chemotherapie aus. In diesem Fall scheint allerdings die endokrine Therapie meist weniger wirksam zu sein (Kreienberg et al. 2010).

Ein weiterer neuer Prognosefaktor, welcher zunehmend hinzugezogen wird, ist der Nachweis isolierter Tumorzellen im Knochenmark (disseminierte Tumorzellen, DTC) und zirkulierender (epithelialer) Tumorzellen im Blut (CETC). Der immunzytochemische Nachweis von epithelialen Tumorzellen im Knochenmark ist ein unabhängiger prognostischer Marker hinsichtlich des rezidivfreien und des Gesamtüberlebens. Der Nachweis von DTC im Knochenmark ist aber nicht mit einer Fernmetastasierung (M1) gleichzusetzen. Die Identifikation von Patientinnen mit erhöhtem Rezidivrisiko, die eventuell eine verlängerte adjuvante Therapie benötigen, ist hierdurch möglich. Nachteil der Bestimmung disseminierter Tumorzellen ist, dass das Verfahren invasiv und schmerzhaft ist. Daher scheint die Bestimmung zirkulierender Tumorzellen aus dem peripheren Blut als weniger invasives Verfahren von Vorteil (Kreienberg et al. 2010).

2.3 Detektion zirkulierender Tumorzellen

Der Erfolg der Brustkrebstherapie hängt zu einem großen Teil von der Metastasierung des Primärtumors ab (Mostert et al. 2009). Deshalb wird ständig nach neuen Methoden zum frühzeitigen Auffinden von Tumorabsiedlungen und zur Überwachung des Therapieerfolges geforscht. Die Detektion zirkulierender Tumorzellen stellt einen Weg dar, das Metastasierungsrisiko zu früheren Zeitpunkten und damit in einem weniger invasiven Stadium der Tumorerkrankung abzuschätzen, als es durch klinische Befunde, Bildgebung oder mithilfe der Serum-Tumormarker möglich ist (Mostert et al. 2009). Zirkulierende

Tumorzellen sind definitionsgemäß Zellen, die im peripheren Blut von Patienten zu finden sind und entweder vom Primärtumor oder seinen Metastasen stammen. Davon abzugrenzen sind isolierte Tumorzellen, die sich im Knochenmark, in den Lymphknoten oder in anderen Organen befinden und auch als disseminierte Tumorzellen bezeichnet werden (Braun et al. 2005; Luzzi et al. 1998; Paterlini-Brechot et al. 2007).

Schwierigkeiten beim Aufspüren von zirkulierenden Tumorzellen stellt unter anderem die (inter- und intratumorale) Heterogenität der Tumorzellen dar, sodass bisher noch keine Methode entwickelt werden konnte, die in der Lage ist, sämtliche zirkulierende Tumorzellen eines Primärtumors oder generell Tumorzellen verschiedener Malignome zu identifizieren (Allan et al. 2010; Mostert et al. 2009).

Eine weitere Herausforderung bei der Detektion zirkulierender Tumorzellen ergibt sich auch durch ihre, im Vergleich zu anderen im Blut vorhandenen Zellen, geringe Anzahl. So ist davon auszugehen, dass man unter 10^6 – 10^7 Leukozyten nur eine Tumorzelle findet (Allan & Keeney 2010; Mostert et al. 2009; Paterlini-Brechot & Benali 2007; Ross et al. 1993; Sleijfer et al. 2007).

Viele der bisher entwickelten Verfahren nutzen deshalb verschiedene Anreicherungstechniken, bevor im Anschluss die eigentliche Tumorzell-detektion stattfindet (Mostert et al. 2009). Eine Möglichkeit der Anreicherung stellt die immunomagnetische Separation dar, die zur Selektion der Tumorzellen Antikörper nutzt, welche mit magnetischen Teilchen konjugiert sind (Allard et al. 2004; Mostert et al. 2009; Paterlini-Brechot & Benali 2007). Sowohl für die Tumorzellanreicherung mittels immunomagnetischer Separation, als auch für die genaue Identifikation der zirkulierenden Tumorzellen können verschiedene Markermoleküle/Antigene genutzt werden, die spezifisch auf epithelialen Zellen exprimiert werden oder nur in bestimmten Geweben ausgeprägt sind (epithel- und gewebespezifische Marker) (Allan & Keeney 2010; Mavroudis 2010; Paterlini-Brechot & Benali 2007). Insbesondere Cytokeratine als Bestandteil der Intermediärfilamente des Cytoskeletts epithelialer Zellen und das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) werden häufig genutzt, da sie normalerweise nicht auf den mesenchymalen hämatopoetischen Zellen zu finden sind (Allan & Keeney 2010; Apostolaki et al. 2007; Mavroudis 2010). Zudem existieren auch organ- oder tumortyp-spezifische Marker, die zur Identifikation von Tumorzellen herangezogen werden können. Für das Mammakarzinom gelten Mammaglobulin-1, HER2 oder Mucin-1 als relativ spezifisch, wobei insbesondere

Mammaglobulin-1 und HER2 nicht gänzlich organ- bzw. tumorspezifisch sind (Allan & Keeney 2010; Berois et al. 2000; Mavroudis 2010; Paterlini-Brechot & Benali 2007; Stathopoulou et al. 2002).

Außerdem besteht die Möglichkeit, Oberflächenmoleküle, wie das leukocytenspezifische Antigen CD45, zur negativen Selektion von Leukocyten und anderen Blutzellen zu nutzen (Allan & Keeney 2010; Goodale et al. 2009; Jacob et al. 2007; Mostert et al. 2009).

Andere Anreicherungsverfahren basieren hingegen auf morphologischen Kriterien der Tumorzellen, wie z.B. die Zellgröße oder -dichte (Mavroudis 2010; Mostert et al. 2009; Paterlini-Brechot & Benali 2007; Pinzani et al. 2006; Wong et al. 2006). Alle Anreicherungsverfahren haben jedoch aufgrund der Heterogenität der Tumorzellen in Größe, Dichte und Markerexpression vor allem Defizite in der Sensitivität (und Spezifität), sodass bereits im Vorfeld der eigentlichen Detektion wahrscheinlich zahlreiche Zellen verloren gehen (Mostert et al. 2009).

Bei der anschließenden Detektion der Tumorzellen kann man allgemein zwischen cytometrischen und molekulargenetischen Methoden unterscheiden (Mostert et al. 2009; Paterlini-Brechot & Benali 2007). Die cytometrischen Verfahren nutzen ebenfalls Antikörper gegen die oben genannten epithel- oder gewebespezifischen Antigene. Die meist PCR-basierten molekulargenetischen Assays weisen hingegen bestimmte gewebsspezifische Transkripte anhand der mRNA-Konzentrationen nach (Berois et al. 2000; Bossolasco et al. 2002; Mavroudis 2010; Schoenfeld et al. 1997; Stathopoulou et al. 2002).

Während die molekularen Assays allgemein als sensibler angesehen werden, liegt der Vorteil vieler cytometrischer Verfahren darin, dass zusätzlich die Möglichkeit zur visuellen Beurteilung der Morphologie und zur molekularen Phänotypisierung der detektierten Zellen besteht (Mavroudis 2010; Mostert et al. 2009; Ring et al. 2005; Smith et al. 2000).

Zwei Verfahren werden stellvertretend für eine Vielzahl von Methoden nachfolgend näher erläutert:

Das CellSearch™-System reichert zunächst EpCAM-positive Zellen aus dem peripheren Blut immunomagnetisch an. Nachfolgend werden die angereicherten Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen verschiedene Cytokeratine und DAPI (4-, 6- Diamidino- 2- Phenylindol), einer DNA-interkalierenden Substanz, gefärbt (Allan & Keeney 2010; Cristofanilli et al. 2004). Zur Abgrenzung von hämatopoetischen Zellen erfolgt eine Gegenfärbung mit Anti-CD45-

Antikörpern. Anschließend werden alle Zellen, die CK-positiv, DAPI-positiv und CD45-negativ sind, automatisiert durch ein Fluoreszenzmikroskop gezählt.

Unter anderem aufgrund der guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde dieses Verfahren von der FDA (Amerikanische „Food and Drug association“) zur in vitro-Detektion von zirkulierenden Tumorzellen bei metastasiertem Brustkrebs, beim kolorektalen und beim Prostatakarzinom, zugelassen (Mavroudis 2010; Riethdorf et al. 2007).

Im Gegensatz dazu erfolgt bei der von Pachmann et al. entwickelten MAINTRAC™-Methode im Vorfeld keine Anreicherung der Zellen. Alle Zellen, die nach Lyse der Erythrozyten erhalten bleiben, werden mit fluoreszierendem Anti-EpCAM- und Anti-CD-45-Antikörpern angefärbt und anschließend mittels Laser Scanning Cytometrie (LSC) oder Scan^{AR} (Fluoreszenzmikroskop) ausgezählt (Pachmann et al. 2005a; Pachmann et al. 2005b).

2.4 EpCAM als Marker zirkulierender Tumorzellen

Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül, unter anderem auch bekannt als EpCAM, CD326 und HEA 125 wurde 1979 ursprünglich als vorherrschendes Oberflächenantigen auf menschlichen Kolonkarzinomzellen beschrieben (Balzar et al. 1999b; Herlyn et al. 1979; Patriarca et al. 2012; van der Gun et al. 2010). Heute weiß man, dass das transmembrane Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 40 kDa von den meisten Epithelien, mit Ausnahme von Plattenepithelzellen und bestimmten epithelialen Zelltypen wie Hepatocyten und Keratinocyten, auf der basolateralen Membran exprimiert wird (Patriarca et al. 2012; van der Gun et al. 2010; Winter et al. 2003). Auf Zellen mesenchymalen Ursprungs, in neuroendokrinem Gewebe und auf Skelettmuskelzellen konnte EpCAM hingegen nicht nachgewiesen werden (Balzar et al. 1999b; Momburg et al. 1987; Patriarca et al. 2012; Spizzo et al. 2004). Außerdem hat man herausgefunden, dass EpCAM, bei den meisten Karzinomen sowie in prämaligen Läsionen wie Dysplasien und Metaplasien verschiedener epithelialer und epithelverwandter Gewebe, in unterschiedlichem Ausmaß überexprimiert wird (van der Gun et al. 2010). Zudem konnte in Karzinomen oder Dysplasien normalerweise EpCAM-negativer Epithelien, wie beispielsweise dem Plattenepithel der Lunge, eine de novo-Expression nachgewiesen werden (Patriarca et al. 2012). Auch bei verschiedenen Formen des Mammakarzinoms stellte man eine Überexpression des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls fest. Insbesondere duktale Formen wiesen im Vergleich zu lobulären Karzinomen deutlich höhere Expressionslevel auf (Allard et al. 2004; Patriarca et al. 2012).

Das aus 314 Aminosäuren zusammengesetzte EpCAM-Protein besteht aus einer großen Extrazellulärdomäne, einer einzelnen Transmembrandomäne und einem kurzen intrazellulären Abschnitt (Baeuerle et al. 2007; Balzar et al. 1999b; Patriarca et al. 2012; van der Gun et al. 2010). Es unterscheidet sich strukturell wesentlich von anderen Zelladhäsionsmolekülen durch das Fehlen der sich wiederholenden Subdomänen (Aplin et al. 1998; Balzar et al. 1999a; Horwitz et al. 1996; Litvinov et al. 1994a; Trzpis et al. 2007). Kodiert wird EpCAM durch das auf dem langen Arm von Chromosom 4 lokalisierte Gen GA733-2 (Balzar et al. 1999b; Linnenbach et al. 1993).

Wie man bereits aus der Bezeichnung ableiten kann, ist das Glykoprotein an der Vermittlung epithel-spezifischer interzellulärer Adhäsionsprozesse beteiligt (Patriarca et al. 2012). Einerseits fungiert EpCAM über seine intrazelluläre cytoplasmatische Domäne selbst als homophiles interzelluläres Adhäsionsmolekül und verhindert damit das Herauslösen von Zellen aus dem Verband (Balzar et al. 1999a; Litvinov et al. 1994b; van der Gun et al. 2010). Andererseits ist EpCAM auch dazu in der Lage, die E-Cadherin-vermittelte Zelladhäsion zu stören und damit die Metastasierung von Zellen zu begünstigen (van der Gun et al. 2010; Winter et al. 2003). Doch die Funktion beschränkt sich nicht nur auf Zelladhäsionsprozesse. Es konnte gezeigt werden, dass EpCAM auch an zellulären Signaltransduktionsprozessen beteiligt ist und Prozesse wie Migration, Proliferation und Differenzierung von Zellen fördert (Maetzel et al. 2009; Okegawa et al. 2004; Patriarca et al. 2012; Trzpis et al. 2007; van der Gun et al. 2010). Daher spielt EpCAM eine sehr zwiespältige Rolle im Rahmen der Tumorgenese und Metastasierung (Patriarca et al. 2012; van der Gun et al. 2010).

Aufgrund seiner Expressionscharakteristika und Funktionen liegt nahe, dass EpCAM diagnostische sowie prognostische Bedeutung besitzt und ein attraktives Zielmolekül im Rahmen der Immuntherapie darstellt (Patriarca et al. 2012). Da EpCAM ausschließlich auf Zellen epithelialen Ursprungs und normalerweise nicht auf (mesenchymalen) hämatopoetischen Zellen zu finden ist, eignet es sich folglich als Marker zur Detektion und Isolation von im Blut zirkulierenden Tumorzellen. Außerdem kann das epitheliale Antigen zur Unterscheidung von histologisch schwer abzugrenzenden Tumoren beitragen. Ein Beispiel hierfür ist die Differenzierung zwischen dem hauptsächlich EpCAM-positiven cholangiocellulären Karzinom und dem meist EpCAM-negativen hepatozellulären Karzinom (Balzar et al. 1999b; de Boer et al. 1999; Patriarca et al. 2012). Für zahlreiche Karzinome

konnte ein Zusammenhang zwischen einer starken EpCAM-Expression und einer schlechten Prognose gezeigt werden (van der Gun et al. 2010). Auch beim Mammakarzinom war eine Überexpression sowohl bei nodal-positiven als auch bei nodal-negativen Patientinnen mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert (Schmidt et al. 2008; Spizzo et al. 2004; van der Gun et al. 2010). Außerdem konnte dargestellt werden, dass eine starke EpCAM-Expression mit der Tumorgröße und dem Lymphknotenstatus positiv korrelierte (Scheunemann et al. 2008; Spizzo et al. 2004; Tandon et al. 1990; Trzpis et al. 2007; van der Gun et al. 2010). Allerdings spiegeln sich die scheinbar widersprüchlichen Funktionen im Hinblick auf die Tumorprogression und Metastasierung auch in der prognostischen Aussagekraft wider. Denn sowohl beim Schilddrüsenkarzinom (Ensinger et al. 2006; Ralhan et al. 2010; van der Gun et al. 2010) als auch beim klarzelligen Nierenkarzinom (Klatte et al. 2009; Seligson et al. 2004; van der Gun et al. 2010) ist eine EpCAM-Expression mit einer günstigen Prognose verbunden.

2.5 Endokrine Therapie

Die Voraussetzung für die Möglichkeit zur Durchführung einer Hormontherapie ist ein positiver Östrogen- und/oder Progesteronrezeptorstatus, da dies die stärksten prädiktiven Faktoren für das Ansprechen einer endokrinen Behandlung sind (Böcker et al. 2008b; Kreienberg et al. 2010).

Insbesondere die Expression beider Hormonrezeptoren ist mit einem starken Ansprechen auf die Therapie assoziiert (Arpino et al. 2005; Williams et al. 1987). Unterdessen ist die fehlende Ausprägung von Progesteronrezeptoren bei gleichzeitiger Östrogenrezeptorexpression mit einem geringeren Ansprechen verbunden (Arpino et al. 2005).

Die Bestimmung des Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus sollte vor Einleitung jeglicher Therapie durch den Pathologen erfolgen (Kreienberg et al. 2012). Dieser beurteilt das immunhistochemische Färbeverhalten von Tumorzellkernen und gibt dieses als Prozentsatz positiver Tumorzellen an. Außerdem wird die Bestimmung weiterer Scores empfohlen, die zusätzlich auch die Färbeintensität berücksichtigen (Kreienberg et al. 2012; Kreienberg et al. 2010). Zur Anwendung kommen der in Deutschland weit verbreitete, immunreaktive Score nach Remmele und Stegner (Remmele et al. 1987) oder der sogenannte Allred-(Quick)-Score (Kreienberg et al. 2012; Kreienberg et al. 2010).

Der Grenzwert, ab wann ein Brustkrebs als hormonrezeptorpositiv bezeichnet wird, steht weiterhin zur Diskussion.

Lange Zeit galt der Tumor erst als hormonsensitiv, wenn mehr als 10% der Tumorzellen Östrogen- und /oder Progesteronrezeptoren exprimieren. Allerdings wird derzeit eine endokrine Therapie auch bei geringerer Expression (bzw. bei jeglicher Expression) empfohlen, da gezeigt werden konnte, dass bereits ab 1% Rezeptorexpression in den Tumorzellen mit einem Ansprechen auf die Hormontherapie gerechnet werden kann (Goldhirsch et al. 2009; Goldhirsch et al. 2011; Kreienberg et al. 2012).

| Prozentsatz positiver Zellkerne (PP) | | Färbeintensität (FI) | | Score |
|--|----------|------------------------|----------|----------------------------|
| Immunreaktiver Score (IRS) (Remmele W et al. 1987) | | | | |
| Keine positiven Kerne | 0 Punkte | keine Farbreaktion | 0 Punkte | PP x FI= IRS (0-12 Punkte) |
| < 10 % positive Kerne | 1 Punkt | schwache Färbereaktion | 1 Punkt | |
| 10-50 % positive Kerne | 2 Punkte | mäßige Färbereaktion | 2 Punkte | |
| 51-80 % positive Kerne | 3 Punkte | starke Färbereaktion | | |
| > 80 % positive Kerne | 4 Punkte | | | |
| Allred-Score (AS) (Harvey, JM et al. 1999) | | | | |
| Keine positiven Kerne | 0 Punkte | keine Farbreaktion | 0 Punkte | PP + FI= AS (0-8 Punkte) |
| < 1 % positive Kerne | 1 Punkt | schwache Färbereaktion | 1 Punkt | |
| 1-10 % positive Kerne | 2 Punkte | mäßige Färbereaktion | 2 Punkte | |
| 11-33 % positive Kerne | 3 Punkte | starke Färbereaktion | 3 Punkte | |
| 34-66 % positive Kerne | 4 Punkte | | | |
| > 66 % positive Kerne | 5 Punkte | | | |

Tab. 1: Immunhistochemische Scores zur Hormonrezeptorbestimmung.

Etwa 60-80% aller Patientinnen mit Brustkrebs haben einen positiven Hormonrezeptorstatus (Crohns et al. 2009; Wörmann et al. 2011) und sind somit für eine endokrine Therapie geeignet.

Neben dem Hormonrezeptorstatus ist der Menopausenstatus ein weiterer wesentlicher Aspekt bei der Planung einer Hormontherapie.

Dieser wird sowohl anamnestisch als auch durch die Messung der Sexualhormone (FSH und Östradiol E2) eruiert (Wörmann et al. 2011). Die Mehrzahl der Patientinnen mit Brustkrebs, etwa 65 – 70 %, befindet sich in der Postmenopause (Crohns et al. 2009).

Im Rahmen der endokrinen Therapie kommen Antiöstrogene wie der selektive Östrogen-Rezeptor-Modulator (SERM) Tamoxifen, Aromataseinhibitoren wie Anastrozol, Letrozol oder Exemestan sowie Analoga des Gonadotropin-Releasing-Hormons wie Goserelin und

Leuprorelin zur Anwendung (Crohns et al. 2009; Preiß et al. 2012; Wörmann et al. 2011). Letztere werden insbesondere bei Frauen in der Prämenopause zur Unterdrückung der ovariellen Östrogensynthese eingesetzt. Zur irreversiblen Suppression der Ovarialfunktion wurden früher auch die Ovariectomie und die sogenannte Radiomenolyse, die strahlentherapeutische Ovariectomie, durchgeführt (Kreienberg et al. 2010; Wörmann et al. 2011). Alle 3 Methoden sind gleichwertig (Preiß et al. 2012; Wörmann et al. 2011).

Eine der etabliertesten Substanzen der endokrinen Therapie ist Tamoxifen (Crohns et al. 2009). Es zählt zu den schon erwähnten selektiven Östrogenrezeptormodulatoren, da sowohl agonistische Effekte als auch antagonistische Effekte zellspezifisch vermittelt werden (Karow et al. 2011).

Diese gegensätzlichen Wirkungen sind (wahrscheinlich) sowohl auf ein unterschiedliches Bindungsverhalten am alpha- und beta-Östrogenrezeptor (Crohns et al. 2009), als auch auf Konformations-/Strukturunterschiede der Ligand/Wirkstoff-Östrogenrezeptor-Komplexe zurückzuführen (Lüllmann et al. 2006; Mutschler et al. 2001).

Die entscheidende Wirkung im Rahmen der Therapie des Mammakarzinoms ist der Östrogen-antagonistische Effekt an der Brust, der mit einer Wachstumshemmung hormonabhängiger Tumorzellen verbunden ist (Kreienberg et al. 2010).

Ein weiterer, für die Behandlung des Brustkrebses wichtiger Effekt, ist die Angiogenesehemmung, die unabhängig von der antiöstrogenen Wirkung durch Tamoxifen hervorgerufen wird (Gagliardi et al. 1993; Schneider et al. 2005).

Östrogen-antagonistische Wirkungen können allerdings auch zu unerwünschten Begleiteffekten führen. Diese können sich beispielsweise in Form von klimakterischen Beschwerden wie Hitzewallungen äußern (Karow & Lang-Roth 2011; Lüllmann et al. 2006).

Agonistische Wirkungen von Tamoxifen werden vor allem an den Östrogenrezeptoren des Endometriums, im Sinne einer Proliferationssteigerung, beobachtet. Die Folgen sind ein gesteigertes Risiko für Endometriumhyperplasien und -polypen sowie höhere Raten an Endometriumkarzinomen (Karow & Lang-Roth 2011; Kreienberg et al. 2010; Lüllmann et al. 2006).

Auch die erhöhte Thrombemboliegefahr ist auf agonistische Wirkungen zurückzuführen.

Durchaus erwünscht können die agonistischen Wirkungen auf den Knochen- und Lipidstoffwechsel sein. Insbesondere bei gleichzeitig bestehender Osteoporose kann die

Gabe von Tamoxifen von Vorteil sein (Bodmer & Castiglione 2011; Crohns et al. 2009; Kreienberg et al. 2010).

Eine weitere wichtige Substanzgruppe für die Hormontherapie sind die Aromataseinhibitoren. Diese greifen direkt in die Östrogensynthese ein, indem sie die Umwandlung von Androgenen in Östrogene, durch das Enzym Aromatase, blockieren.

Während prämenopausal die Östrogenbildung vor allem im Ovar stattfindet, sind nach Erlöschen der Ovarialfunktion insbesondere das subkutane Fettgewebe und die Nebennierenrinde für die Östrogenbildung, wenn auch in geringeren Mengen, verantwortlich (Karow & Lang-Roth 2011; Lüllmann et al. 2006).

Aromataseinhibitoren spielen insbesondere in der Postmenopause eine wichtige Rolle. Dies ist mit der geringeren Wirksamkeit bei Patientinnen mit intakter Ovarialfunktion zu begründen, bei denen es regelkreisgesteuert durch die Hemmung der Östrogensynthese/Aromatasehemmung zu einer vermehrten FSH-Freisetzung kommt, die wiederum eine kompensatorische Steigerung der Aromatasesynthese zur Folge hat (Crohns et al. 2009; Karow & Lang-Roth 2011; Lüllmann et al. 2006).

Derzeitiger Standard einer adjuvanten endokrinen Therapie bei Patientinnen in der Prämenopause ist die Gabe von Tamoxifen über 5 Jahre. Zusätzlich kann eine Unterdrückung der Ovarialfunktion mittels GnRH-Analoga für 1,5 bis 5 Jahre durchgeführt werden. Allerdings scheint diese Kombination keinen zusätzlichen Nutzen zu haben, weshalb sie als umstritten gilt (Baum et al. 2006; Bodmer & Castiglione 2011; Goldhirsch et al. 2011; Goss et al. 2003). Besteht eine Kontraindikation für den Einsatz von Tamoxifen wird alternativ die Kombination aus einem Aromatasehemmer und einem GnRH-Analagon empfohlen (Bodmer & Castiglione 2011; Gnant et al. 2009; Goldhirsch et al. 2011).

Wenn ebenfalls eine adjuvante Chemotherapie indiziert ist, sollte mit der endokrinen Therapie erst nach Abschluss der Chemotherapie begonnen werden (chemoendokrine Sequenztherapie).

Insbesondere nach einer Chemotherapie, die ebenfalls zu einem irreversiblen Verlust der Ovarialfunktion führen kann, ist die Gabe von GnRH-Analoga mit keinem zusätzlichen Nutzen verbunden (EBCTCG 2005; Bodmer & Castiglione 2011; Goldhirsch et al. 2011).

Für postmenopausale Frauen mit hormonsensiblen Mammakarzinom gibt es hingegen drei verschiedene zugelassene Therapieansätze (Bodmer & Castiglione 2011; Crohns et al. 2009; Kreienberg et al. 2012; Kreienberg et al. 2010):

- Up-front-Monotherapie: Aromatasehemmer der dritten Generation (z.B. Anastrozol, Letrozol) über 5 Jahre
- Sequenztherapie: nach 2-3 Jahren Tamoxifen erfolgt ein Switch zu einem Aromatasehemmer der dritten Generation für weitere 2-3 Jahre (oder umgekehrt)
- Erweiterte adjuvante endokrine Therapie: Switch nach 5 Jahren Tamoxifen zu einem Aromatasehemmer der dritten Generation über weitere 3-5 Jahre

Aromatasehemmer haben besonders in der Therapie des hormonsensiblen, postmenopausalen Mammakarzinoms an Bedeutung gewonnen (Kreienberg et al. 2010).

Sie verdrängen zunehmend das Tamoxifen, beziehungsweise sind eine sehr gute Ergänzung in der adjuvanten Situation, da Aromataseinhibitoren der dritten Generation eine stärkere antiproliferative Aktivität und eine bessere Spezifität bei gleichzeitig geringerer Toxizität besitzen (Kreienberg et al. 2010).

Das spiegelt sich auch in den Ergebnissen der ATAC-Studie wider, die die up-front –Therapie mit einem Aromatasehemmer mit der Tamoxifentherapie vergleicht. Diese ergab ein selteneres Auftreten kontralateraler Mammakarzinome, eine geringere Rate an Endometriumkarzinomen und weniger thrombembolische Komplikationen beim Einsatz des Aromatasehemmers (Dowsett 2003). Demgegenüber stehen eine Zunahme an osteoporotischen Frakturen und muskuloskelettalen Schmerzen (Crohns et al. 2009; Dowsett 2003). Auch Gedächtnisstörungen und klimakterische Beschwerden traten gehäuft unter dem Aromataseinhibitor auf (Crohns et al. 2009; Dowsett 2003).

Dennoch wird in bestimmten Situationen Tamoxifen auch bei postmenopausalen Patientinnen bevorzugt. Vor allem bei älteren Frauen mit schwerer Osteoporose, einem nodal-negativen Tumor, niedrigem Grading und damit geringem Rezidivrisiko, stellt Tamoxifen eine gute Option dar (Bodmer & Castiglione 2011; Goldhirsch et al. 2011).

Hingegen sollten Aromatasehemmer insbesondere bei nodal-positiven postmenopausalen Patientinnen oder hohem Rezidivrisiko frühzeitig zum Einsatz kommen (Bodmer & Castiglione 2011; Preiß et al. 2012).

Die endokrine Therapie spielt auch in der palliativen Situation eine bedeutende Rolle. Bei Patientinnen mit hormonrezeptorpositivem Mammakarzinom sollte einer endokrinen Therapie sogar der Vorzug gegenüber einer palliativen Chemotherapie gegeben werden (Kreienberg et al. 2012; Preiß et al. 2012; Wörmann et al. 2011).

Dieses Vorgehen ist ein wichtiger Unterschied zur adjuvanten Therapie, bei der wie bereits geschildert, die Hormontherapie erst im Anschluss an eine Chemotherapie begonnen werden sollte. Ausnahmen bilden Situationen, in denen eine schnelle Remission erzielt werden muss. Dies ist unter anderem bei akuter vitaler Bedrohung oder drohendem Funktionsausfall von Organen infolge visceraler Metastasierung der Fall (Preiß et al. 2012). Auch eine schnelle Progredienz des Tumorwachstums kann eine primäre palliative Chemotherapie erforderlich machen.

Welches therapeutische Regime angewandt wird, ist wiederum vom Menopausenstatus abhängig. Zudem sind adjuvante und palliative Vorthérapien der einzelnen Patientinnen zu berücksichtigen. Auch das Metastasierungsmuster ist bei der Planung einer palliativen Systemtherapie zu berücksichtigen. Beispielsweise ist eine Hormontherapie bei Hirnmetastasen nicht suffizient und daher nicht indiziert (Kreienberg et al. 2012).

Für den neoadjuvanten Einsatz einer Hormontherapie sprechen verschiedene Studienergebnisse. Insbesondere bei postmenopausalen Frauen mit einem höherem Alter, welches als prädiktiver Faktor für eine geringere Effizienz einer cytostatischen Therapie spricht, kann durch den präoperativen Einsatz von Aromatasehemmern eine Reduktion des Tumolvolumens erreicht werden (Bodmer & Castiglione 2011; Goldhirsch et al. 2011; Kreienberg et al. 2010). Dies trägt auch zu einer höheren Rate an brusterhaltenden Operationen bei. Derzeit werden für solche Situationen Aromatasehemmer favorisiert (Bodmer & Castiglione 2011; Goldhirsch et al. 2009).

| Prämenopausale Patientin | | Postmenopausale Patientin | | |
|--------------------------|---|--|---|--|
| Neoadjuvante ET | | Aromatasehemmer über 8 Monate derzeit favorisiert (in Studien) | | |
| | | Option 1 | Option 2 | Option 3 |
| Adjuvante ET | Tamoxifen (5 Jahre) +/- GnRH-Analoga (1,5 bis 5 Jahre) bei Kontraindikation für Tamoxifen: Aromatasehemmer (3.Generation) +/- GnRH-Analoga (1,5 bis 5 Jahre) | Up-front-Therapie: Aromatasehemmer über 5 Jahre | Sequenztherapie: 2-3 Jahre Tamoxifen → 2-3 Jahre Aromatasehemmer (3.Generation) | Extended therapy: 5 Jahre Tamoxifen → 3-5 Jahre Aromatasehemmer (3.Generation) |
| Palliative ET | | | | |
| 1st-line | Tamoxifen (bis zum Progress) + GnRH-Analoga /Ovarektomie | Aromatasehemmer (3.Generation) | Tamoxifen | Fulvestrant |
| 2nd-line | bei Progress oder KI für Tamoxifen: Aromatasehemmer (3.Generation) + GnRH-Analoga /Ovarektomie | alternativer Aromatasehemmer oder Tamoxifen oder Fulvestrant je nach Vortherapie | | |
| 3rd-line | (Östrogenantagonist Fulvestrant) | Gestagene | | |
| 4th-line | Gestagene | | | |

Abb. 1: Algorithmus zur endokrinen Therapie (modifiziert nach Crohns et al. 2009 und DGHO-Leitlinie 2009).

3 Zielstellung der Arbeit

Ziel der Arbeit ist die Untersuchung zirkulierender epithelialer Tumorzellen bei primär nicht metastasierten, hormonrezeptorpositiven Brustkrebspatientinnen. Speziell wurde das Verhalten der Zellen unter endokriner Therapie mit Tamoxifen bzw. bei switch von Tamoxifen auf einen Aromatasehemmer untersucht. Hierbei wurden alle geläufigen Aromatasehemmer (Anastrozol, Letrozol und Exemestan) eingeschlossen.

Es wurde das Verhalten der CETC von Patientinnen untersucht, die Tamoxifen als Monotherapie erhielten, von Patientinnen, die einen Switch von Tamoxifen auf einen Aromataseinhibitor (entsprechend den aktuellen S3-Leitlinien) erhielten sowie von Hochrisikopatientinnen, die von Beginn an einen Aromataseinhibitor erhielten.

Es wurde die Abhängigkeit eines Rezidivs bzw. Progress der Erkrankung von der Kinetik der zirkulierenden epithelialen Tumorzellen in den drei verschiedenen Gruppen betrachtet. Die erhobenen Daten ermöglichen gegebenenfalls eine individuelle Risikoabschätzung des Krankheitsverlaufs in der Zukunft.

Folgende Fragestellungen sollen Inhalt dieser Arbeit sein:

1. Wie verhalten sich zirkulierende Tumorzellen unter der Tamoxifen-Monotherapie?
Kann ein Anstieg der Zellen in Zusammenhang mit einem möglichen Rezidiv gebracht werden?
2. Wie verhalten sich die zirkulierenden epithelialen Tumorzellen beim leitliniengerechten Switch der Hormontherapie? Ist eine mögliche Änderung der Zellkinetik mit einem Event in der Anamnese der Patientin zu korrelieren?
3. Können die Zellzahlen bei Hochrisikopatientinnen, die primär einen Aromataseinhibitor erhielten, in Zusammenhang mit einem möglichen Rezidiv bzw. Progress gebracht werden?
4. Gibt es prognostische Unterschiede zwischen den verschiedenen Therapieregimen im Patientenkollektiv?

4 Material und Methoden

4.1 Patientenkollektiv

In einem Zeitraum zwischen November 2002 und August 2012 wurden insgesamt 258 Patientinnen der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Friedrich-Schiller-Universität Jena untersucht. Bei allen Frauen lag die klinisch gesicherte Diagnose des Mammakarzinoms vor. Es wurden Blutproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei Vorstellung in der Ambulanz der Frauenklinik entnommen: möglichst bei Erstdiagnose, prä- und postoperativ, zu Beginn eines jeden Chemotherapiezyklus, während der Chemotherapie sowie im Nachuntersuchungszeitraum.

Die Patientinnen waren im Mittel 56,7 Jahre alt (Median 57) und hormonrezeptorpositiv. Das Tumorstadium wurde nach der histopathologisch anerkannten Methode der TNM-Klassifikation eingeteilt. Die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus sowie aller weiteren tumorbiologischen und –histologischen Faktoren erfolgten durch das pathologische Institut der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

In die Untersuchung wurden ausschließlich Patientinnen eingeschlossen, deren Tumor einen positiven Hormonrezeptorstatus aufwies und die eine endokrine Therapie erhielten. Besonderes Augenmerk wurde in der vorliegenden Arbeit auf den Therapieeffekt durch Aromatasehemmer gelegt, vor allem nach Vorbehandlung mit dem Antiöstrogen Tamoxifen.

Bei der Mehrzahl der Frauen wurde ein pT1-pT2- Karzinom (T1=105; T2=68) diagnostiziert. Bei 7 Patientinnen war das T-Stadium zum Zeitpunkt der Erstdiagnose unklar. Die genaue Aufschlüsselung des TNM-Stadiums des Patientenkollektivs ist dem im Auswertungsteil zu entnehmen (Kapitel 5.1).

Abb. 2 zeigt, welche Patientinnen welche endokrine Therapie erhielten. Die meisten Patientinnen bekamen Exemestan (Aromasin®; n=52), wobei bei 18 Frauen ein switch von Tamoxifen zum Aromatasehemmer Exemestan vollzogen wurde und 18 Patientinnen eine andere endokrine Vorthherapie erhielten. Des Weiteren ist der Abbildung zu entnehmen, dass insgesamt 59 Patientinnen Anastrozol (Arimidex®) und 28 Patientinnen Letrozol (Femara®) erhielten. 25 Frauen wechselten von Tamoxifen zu Anastrozol und 14 von Tamoxifen zu Letrozol. Insgesamt wurde somit bei 57 Patientinnen ein Therapieswitch vollzogen.

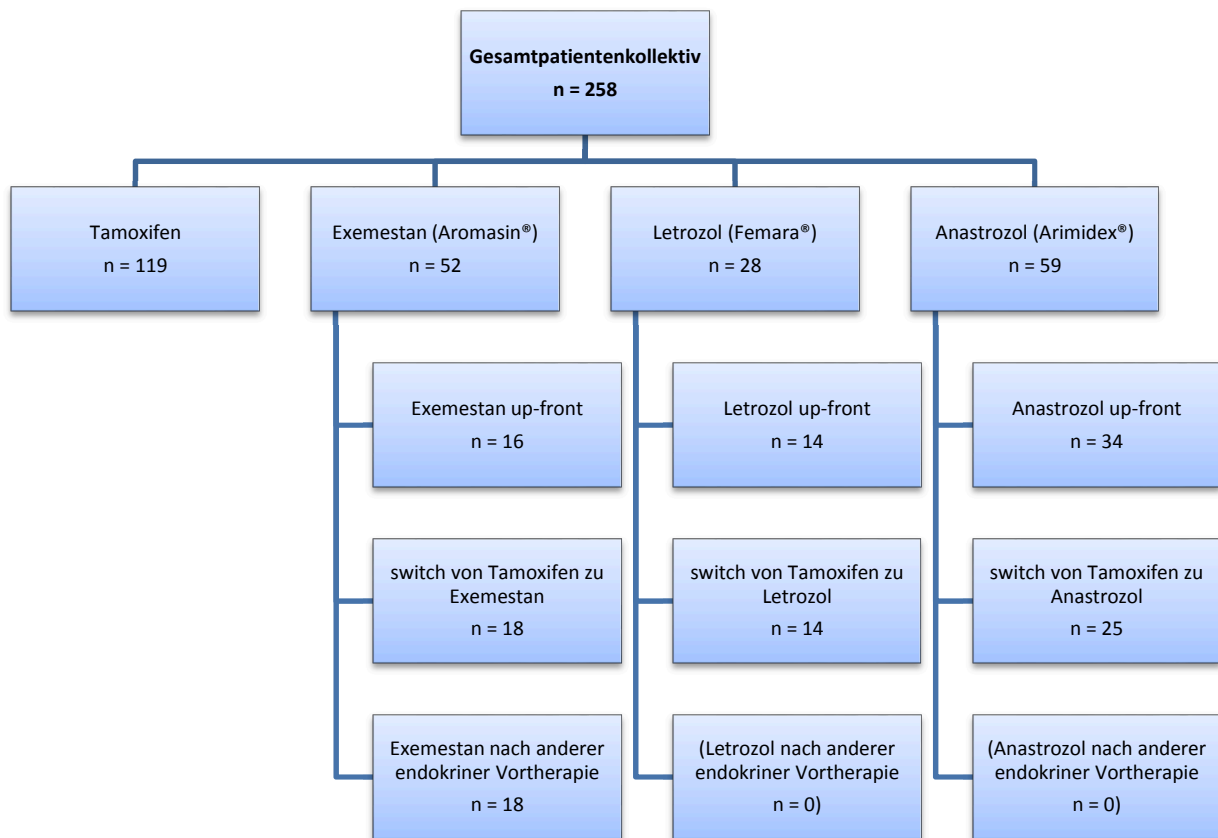


Abb. 2: Darstellung des Patientenkollektivs und Unterteilung in Untergruppen entsprechend der durchgeführten endokrinen Therapie.

102 Patientinnen wurden einer Chemotherapie unterzogen. Davon bekamen 76 (+11) Patientinnen eine adjuvante und 26 Patientinnen eine neoadjuvante Chemotherapie (11 davon bekamen zusätzliche adjuvante Chemotherapie → darunter 2 Patientinnen im Rahmen der HEDON-Studie).

28 Patientinnen erhielten weder eine adjuvante noch eine neoadjuvante Chemotherapie.

Bei 16 Patientinnen ist nicht bekannt, ob sie eine Chemotherapie erhielten oder nicht.

Bei positivem HER2/neu-Rezeptorstatus wurden zudem 29 Patientinnen mit Trastuzumab (7 davon neoadjuvant) und 3 Patientinnen mit Lapatinib behandelt.

Die im Patientenkollektiv eingeschlossenen Patientinnen wurden im Vorfeld über die Studie aufgeklärt und unterzeichneten eine Einverständniserklärung. Unter Berücksichtigung des Datenschutzgesetzes und der Schweigepflicht wurden die Daten ordnungsgemäß, im Einvernehmen mit den Patientinnen und der Friedrich-Schiller-Universität Jena, verwendet. Die Genehmigung der Ethikkommission zur Durchführung der Studie liegt vor.

4.2 Material

| Chemikalien und Lösungen | Hersteller / Erläuterung |
|------------------------------------|---|
| Erythrocytenlysepuffer (EL-Puffer) | Qiagen 900ml einfaches, endionisiertes Wasser mit 100ml EL-Puffer (EDTA 0,179g / NH ₄ Cl 41,5g / KHCO ₃ 5,0g / einfaches endionisiertes H ₂ O auf 500ml) |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat, SIGMA- ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland |
| NH ₄ Cl | Ammoniumchlorid, SIGMA- ALDRICH, CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland |
| KHCO ₃ | Kaliumhydrogencarbonat, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland |
| PE-Puffer | PBS + 50ml 1M EDTA (+ 2mM EDTA) |
| PBS | Phosphate Buffered Saline, GIBCO Invitrogen™, Darmstadt, Deutschland |
| BSA 10% | Rinderserumalbumin in PE, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Formalin 10% | neutral gepuffert, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland |

Tab. 2: Chemikalien und Lösungen

| Antikörper und Farbstoffe | Hersteller / Erläuterung |
|--|---|
| Anti - CD326 (EpCAM)-FITC, (= HEA-FITC) | HEA, MiltenyiBiotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland, monoklonaler (Maus-)Antikörper gegen das humane epitheliale Antigen EpCAM, konjugiert mit Floureszein-Isothiocyanat (FITC) |
| 7AAD (Fluoreszenzfarbstoff) | 7- Aminoactinomycin D, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland, interkaliert mit der DNA von Zellen mit erhöhter Membranpermeabilität |
| CD 45-PE | MiltenyiBiotec GmbH Bergisch Gladbach, Deutschland, Antikörper gegen des Oberflächenantigen |

| | |
|--|---------------------|
| | CD45 von Leukocyten |
|--|---------------------|

Tab. 3: Antikörper und Farbstoffe

| Verbrauchsmaterialien und Labortechnik | Hersteller / Erläuterung |
|--|--|
| Zentrifuge „Megafuge 2.0R“ | Heraeus Instruments®, Hanau, Deutschland |
| Imaging Plate = Wellplatte | Zell-kontakt GmbH, Nörten-Hardenberg, Deutschland, besteht aus 96 Wells (Untersuchungskammern) |
| Objektträger | Polysine® Slides, Menzel GmbH u. Co KG, Braunschweig, Deutschland |
| Deckgläser (18x18 mm) | Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland |
| Pipetten | Eppendorf®, Hamburg, Deutschland |
| Pipettenspitzen | BrandGmbH und Co. KG, Werheim, Deutschland |
| 3ml Pasteurpipetten, unsteril | VWR, Darmstadt, Deutschland |
| 2ml Reagiergefäße, PP | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland |
| 15ml Falcons | Greiner bio-oneCellstart, Frickenhausen, Deutschland |

Tab. 4: Verbrauchsmaterialien und Labortechnik

| Optische Geräte und zugehörige Software | Hersteller / Erläuterung |
|---|---|
| Laser Scanning Cytometer® (LSC) WinCyte™ software | Compucyte Corporation, Cambridge, MA, USA |
| Scan ^ R Olympus IX81 ZDC Analysis und Acquisition – Software-Programme | Olympus Deutschland GmbH , Hamburg, Deutschland; Scan ^ R ist eine modulare, Mikroskop-basierte Imaging-Plattform, die speziell für vollautomatische Bilderfassungen und Datenanalysen biologischer Proben entwickelt wurde |

Tab. 5: Optische Geräte und zugehörige Software

4.3 Methoden

Die zirkulierenden Tumorzellen wurden mit zwei prinzipiell ähnlichen Verfahren bestimmt, welche beide auf der von Pachmann et al. entwickelten MAINTRAC®-Methode beruhen. Zur eigentlichen Detektion der CETC's kamen zwei verschiedene optische Geräte (Fluoreszenzmikroskope) zum Einsatz, das Laser Scanning Cytometer (LSC) und Scan^R.

Das Prinzip der MAINTRAC®-Methode beruht auf der schonenden Aufbereitung der Blutproben ohne eine vorherige Tumorzellanreicherung bzw. vorherige Anreicherungsschritte.

Nach der Lyse von Erythrocyten verbleibt eine Suspension aus den vermeintlichen epithelialen Tumorzellen und einer großen Zahl von Leukocyten (Lymphocyten und Granulocyten). Zur Identifikation der Tumorzellen innerhalb dieser Zellsuspension nutzt die MAINTRAC®-Methode, wie viele andere Verfahren auch, fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM, welches, wie bereits in der Einleitung erwähnt, unter anderem bei Brustkrebs auf der Zellmembran epithelialer Tumorzellen überexprimiert wird.

Beide Messverfahren unterscheiden sich jedoch dahingehend, dass bei der Probenaufbereitung zur Scan^R-Messung auf einen fluoreszenzmarkierten CD45-Antikörper zur negativen Selektion von Leukozyten verzichtet wird.

Außerdem ermöglichen beide Methoden die morphologische Charakterisierung der vermeintlichen Tumorzellen und damit die Beurteilung der Integrität dieser. Zur Einschätzung der Vitalität der epithelialen Tumorzellen wird bei der Scan^R-Messung zusätzlich der Fluoreszenz-Farbstoff 7AAD eingesetzt. Diese DNA-interkalierende Substanz führt bei avitalen Zellen mit Verlust der Barrierefunktion der Zellmembran zu einer intensiven Rotfärbung des Zellkerns.

4.3.1.1 Scan^R-Probenaufbereitung

Von den Patientinnen wurden jeweils 2-7 ml peripher-venösen Blutes in eine EDTA-Monovette abgenommen. Die Aufbereitung und Untersuchung der Proben erfolgte etwa 48h nach Blutentnahme. Grundsätzlich wurde für jede Patientin eine Doppelbestimmung durchgeführt. Für jede dieser beiden Messungen wurde 1ml des entnommenen EDTA-Blutes benötigt. Der in ein 15ml-Falcon pipettierte Milliliter EDTA-Blut wurde zunächst mit 7ml Erythrozyten-Lysepuffer versetzt. Nach einer 10minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Probe für weitere 10 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert. Dies führte zum Absetzen eines erythrozytenfreien Zellpellets am Boden des verwendeten Falcons. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet mit 500µl PBS-EDTA resuspendiert. Anschließend wurden 20µl dieser Zellsuspension mit 20µl Mastermix versetzt. Dieser setzt sich aus 120µl Anti-CD326 (EpCAM)-FITC, 100µl 10%igem BSA, 200µl 7AAD und 580µl PBS-EDTA zusammen. Die Probe wurde hiernach zur Inkubation für 30min in Dunkelheit bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurde die gelabelte Probe mit jeweils 160µl PBS-EDTA auf insgesamt 200µl verdünnt.

Die weitere Aufbereitung der Probe erfolgte bei Dunkelheit um die Fluoreszenz der Antikörper bzw. fluoreszierenden Farbstoffe zu erhalten. 20µl der zuvor verdünnten Suspension wurden nachfolgend weiter verarbeitet und zusammen mit 150µl PBS-EDTA-Formalin-Lösung (75µl PBS-EDTA und 75µl Formalin 10%) in einen Well der Titerplatte pipettiert. Nach 60minütiger Inkubation haben sich die Zellen auf den Boden des Wells abgesetzt und die Messung konnte gestartet werden.

| Protokoll - Probenaufbereitung für die Scan [^] R-Messung | | |
|---|--------|---|
| | 1 ml | EDTA-Vollblut in 15 ml-Falcon |
| + | 7 ml | Ery-Lysepuffer kalt (4°C) |
| | 10 min | Inkubation bei Raumtemperatur (wenn die Lösung schon nach 5 min klar ist, dann nur 5 min) |
| | 10 min | bei 1200 U/min. (300 rcf) zentrifugieren |
| Überstand dekantieren und verwerfen | | |
| Falcon mit Zellpellet auf Zellstoff abtropfen lassen | | |
| in | 500 µl | PBS-EDTA das Pellet resuspendieren |
| 20 µl dieser Zellsuspension in Eppendorf-Tube pipettieren | | |
| | 20 µl | Zellsuspension |
| + | 20 µl | Mastermix, enthält: |
| | | 100 µl 10 % BSA 120 µl Anti-EpCAM-FITC |
| | | 100 µl 7AAD (10µg/ml) 580 µl PBS-EDTA |
| | 30 min | Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln |
| + | 160 µl | PBS-EDTA |
| 20µl dieser Suspension (gelabelte Probe) für Scan[^]R Messung in Well der Mikrotiterplatte vorlegen | | |
| | 20 µl | gelabelte Probe |
| + | 75 µl | PBS-EDTA |
| + | 75 µl | Formalin 10% -Lösung |
| | 60 min | Inkubation |
| Scan[^]R-Messung starten | | |

Abb. 3: Protokoll zur Probenaufbereitung für die Scan[^]R-Messung.

4.3.1.2 Tumorzellanalyse mit Scan^R

Das Scan^R-Fluoreszenz-Mikroskop ist in der Lage, automatisiert jedes einzelne Well systematisch auf grün- und rot fluoreszierende Zellen abzusuchen. Zusammen mit der entsprechenden Messsoftware „Acquisition“ wird anhand der Farbe und Stärke der Fluoreszenzsignale und durch voreingestellte Standardmessparameter und Gates zur Einordnung der Signalintensität eine Vorabklassifikation der Zellen erzeugt. Auf diese Weise werden ausschließlich Zellen registriert, die einen Mindestschwellenwert hinsichtlich der Intensität des grün fluoreszierenden FITC-Anti-EpCAM- Antikörpers überschreiten. Diese werden anschließend in Abhängigkeit von der gemessenen Rotfluoreszenz als lebend oder tot eingestuft. Mit Hilfe der „Analysis“-Software ist es im Anschluss der Messung möglich, die detektierten Zellen zu relokalisieren und visuell zu beurteilen, sodass Artefakte oder Fehlentscheidungen des Systems korrigiert werden können (Abb. 5).

Um als EpCAM-positiv und lebend bezeichnet zu werden, müssen die Zellen verschiedene Kriterien erfüllen (Abb. 4): Sie sollten ein grün fluoreszierendes Käppchen bzw. eine intensive membranäre Grünfärbung aufweisen, eine intakte Zellmembran haben und der Zellkern sollte nicht oder nur geringfügig rot fluoreszieren (EpCAM positiv / 7AAD negativ). Avitale Zellen besitzen hingegen eine intensive Rotfluoreszenz des Zellkerns, da ihre Zellmembran nicht mehr intakt ist und somit die Barrierefunktion versagt und der Farbstoff nicht mehr aus der Zelle gepumpt werden kann. Allerdings besitzen auch lebende Zellen meist eine geringe Rotfluoreszenz, da auch hier der Farbstoff in die Zelle gelangt. Die vitalen Zellen sind jedoch in der Lage, den Farbstoff weitestgehend wieder auszuschleusen.

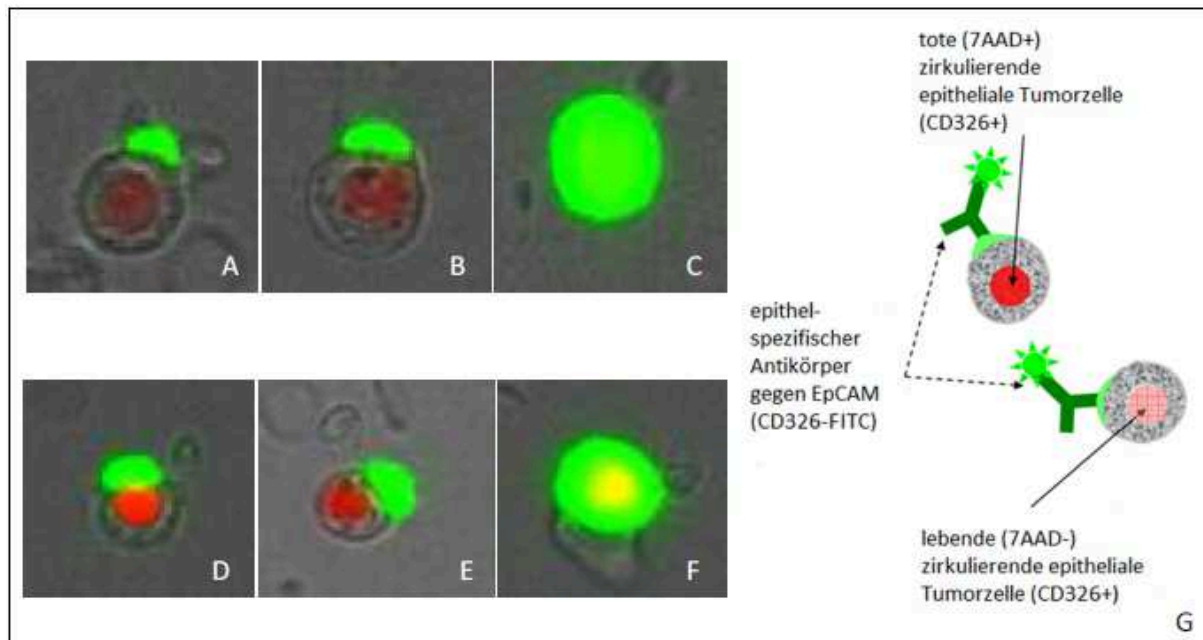


Abb. 4 (A-F): Darstellung vitaler (A-C) und avitaler (D-F) EpCAM-positiver CETC unter dem Scan^R-Mikroskop; (G) schematische Darstellung des MAINTRAC[®]-Prinzips.

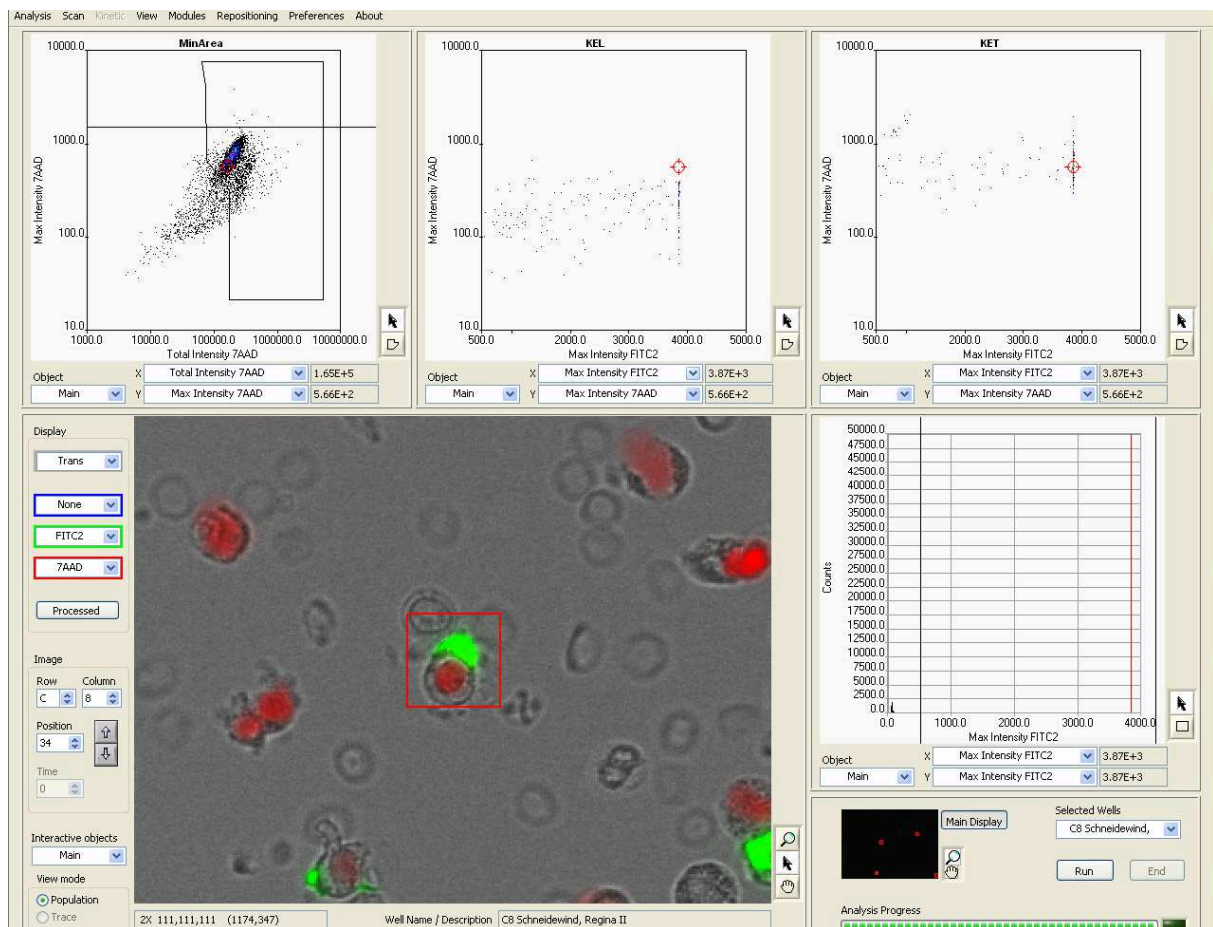


Abb. 5: Bildschirmausschnitt des Analysis Programms zur Auswertung der CETC mit dem Scan^R-Mikroskop.

4.3.2.1 LSC-Probenaufbereitung

Die Präparation für die Messung der CETC mit dem Laser Scanning Cytometer entspricht bis zur Resuspension des durch Erythrocytenlyse und Zentrifugation gewonnenen Zellpellets in 500 µl PE-Puffer der Probenaufbereitung für die Scan[^]R-Messung.

100µl dieser Zellsuspension werden im Anschluss in ein Falcon pipettiert und mit 2,5 µl Anti-HEA(-EpCAM)-Antikörper und 1µl CD45-PE- Antikörper versetzt. Durch Schwenken des Falcons werden Zellsuspension und Antikörper gut miteinander vermischt. Nach einer 15minütigen Inkubationszeit im Kühlschrank (4°C) wird die Probe mit 896,5µl PE-Puffer verdünnt. Anschließend werden 100µl der gelabelten Probe zusammen mit weiteren 80µl PE auf ein definiertes und mit Fettstift markiertes 1cm² großes Feld eines Adhäsionsobjektträgers aufgetragen. Nachfolgend kann die Tumorzellmessung durch das Laser Scanning Cytometer erfolgen.

4.3.2.2 Tumorzellanalyse mit LSC

Der präparierte Objektträger wird auf den Objektisch des LSC-Mikroskopes gelegt. Danach erfolgt unter 20facher Vergrößerung die manuelle Feinjustierung, sodass das zu untersuchende Feld fokussiert und optisch scharf gestellt wird. Danach kann die Messung gestartet werden. Das LSC sucht den Objektträger automatisiert und systematisch mit Hilfe eines Photomultipliers nach Fluoreszenzsignalen von FITC-HEA (EpCAM) und PE-CD45 ab und registriert diese. Die Zellen werden anschließend in Abhängigkeit von der Signalstärke in Streudiagrammen dargestellt (Abb. 6).

Außerdem ermöglicht die Software eine Relokalisierung der Zellen und eine visuelle Begutachtung ihrer Morphologie unter dem Mikroskop.

Die Detektion der CETC erfolgt also durch die Messung der Vorwärtsstreuung des emittierten Lichts und somit anhand der Rot- und Grünfluoreszenz der Zellen. Dabei gelten analog zur Scan[^]R-Messung die Zellen als tumorzellverdächtig, die positiv für das epitheliale Zelladhäsionsmolekül sind und demzufolge ein charakteristisches grün-fluoreszierendes Cap beziehungsweise eine starke membranäre Grün-Färbung aufweisen (Abb. 6). Des Weiteren müssen die Zellen negativ für das Oberflächenmolekül CD45 sein und dürfen deshalb keine Rotfluoreszenz aufweisen. Die zusätzliche Verwendung des CD45-Antikörpers ermöglicht

somit die negative Selektion von fälschlicherweise EpCAM-positiven Lymphozyten und Granulozyten.

Ist die automatisierte Messung vollständig, werden die EpCAM+/CD45- Zellen relokalisiert. Insgesamt werden unter 40facher Vergrößerung 50 Zellen ausgezählt und hinsichtlich ihrer Integrität begutachtet. Außerdem können durch die visuelle Auswertung falsch-positive Ereignisse identifiziert werden. Die Zahl der lebenden Tumorzellen wird anschließend entsprechend der Probenverdünnung auf 1ml Blut hochgerechnet.

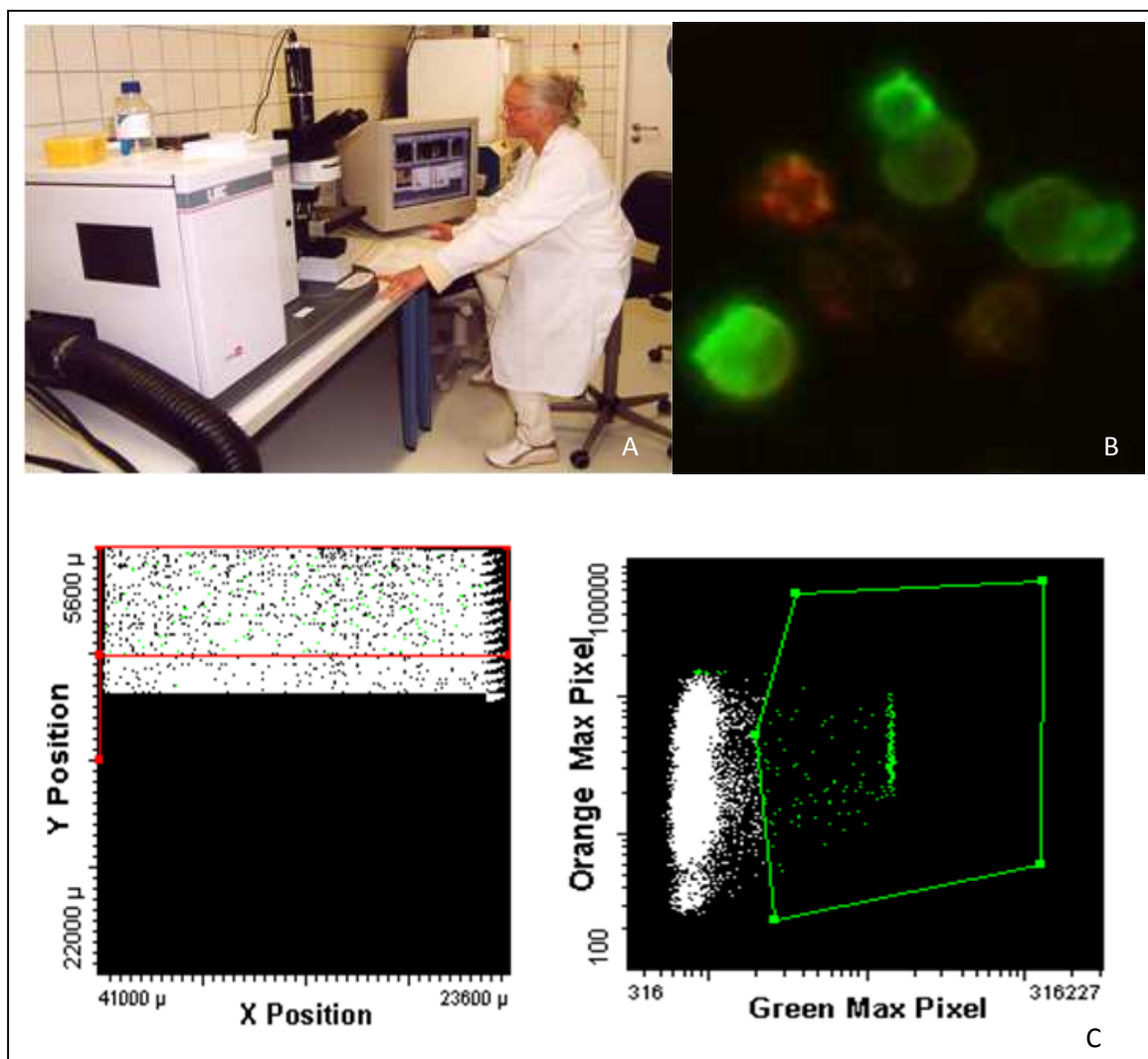


Abb.6 (A-C) Laser Scanning Cytometrie: (A) Frau Prof. Pachmann bei der CETC-Messung mit dem LSC-Mikroskop. (B) Darstellung EpCAM-positiver und CD45-positiver Zellen unter dem LSC-Mikroskop. (C) Typischer Bildschirmausschnitt mit fluoreszierenden EpCAM-positiven Zellen in der Laser Scanning Cytometrie. Die Diagramme stellen Zellen dar, die mit einem rot fluoreszierenden Antikörper gegen das Leukocytenantigen CD45 und mit dem grün fluoreszierenden anti-EpCAM Antikörper markiert wurden.

4.4 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Arbeit wurde SPSS Statistics 17.0 (IBM, Chicago, USA; SPSS for windows) verwendet. Die Korrelationen des CETC-Verlaufes mit dem rezidiv- bzw. progressfreien Überleben unter der jeweiligen endokrinen Therapie wurden in Kaplan-Meier-Überlebenskurven dargestellt. Des Weiteren wurden Kaplan-Meier-Überlebenskurven zur Darstellung des Vergleiches der endokrinen Therapie herangezogen.

5. Ergebnisse

5.1. Hinweise zur Auswertung

Die Anzahl der zirkulierenden epithelialen Tumorzellen wurde für jede einzelne Patientin graphisch dargestellt. Für die Kinetik der CETCs wurde zwischen Anstieg, Abfall und einem konstanten Verlauf unterschieden. Ein Anstieg der zirkulierenden epithelialen Zellen ist so definiert, dass die Zellzahlen um mehr als das 10fache, von einem niedrigsten Punkt aus betrachtet („Nadir“), ansteigen (Abb. 7). Ein Abfall ist so definiert, dass die Zellzahl um mehr als das 10fache vom höchsten Punkt aus absinkt (Abb. 8). Ein konstanter Verlauf wird als ein Schwanken der Zellzahlen um jeweils weniger als das 10fache des Ausgangswertes definiert. Dies soll Abb. 9 veranschaulichen.

Wenn die Zellzahl auf eine vorausgegangene Radiatio hin anstieg, so wurde dieser Anstieg nicht gewertet, da nicht auszuschließen ist, dass der Zellzahlanstieg auf die Bestrahlung zurückzuführen ist.

Es wurden jeweils das Datum der Erstdiagnose, Beginn und Ende der jeweiligen endokrinen Therapie sowie das Progress- bzw. Rezidivdatum und das Datum der letzten Probeentnahme zusammen mit der CETC-Kinetik erfasst. Des Weiteren erfolgte die Dokumentation des Überlebens- bzw. Rezidiv- oder Progresszeitraumes anhand der erhobenen Daten. Dies geschah in Zusammenschau mit der jeweiligen endokrinen Therapie, die betrachtet wurde. Anschließend erfolgte die Auswertung der Daten anhand von Kaplan-Meier-Überlebenskurven.

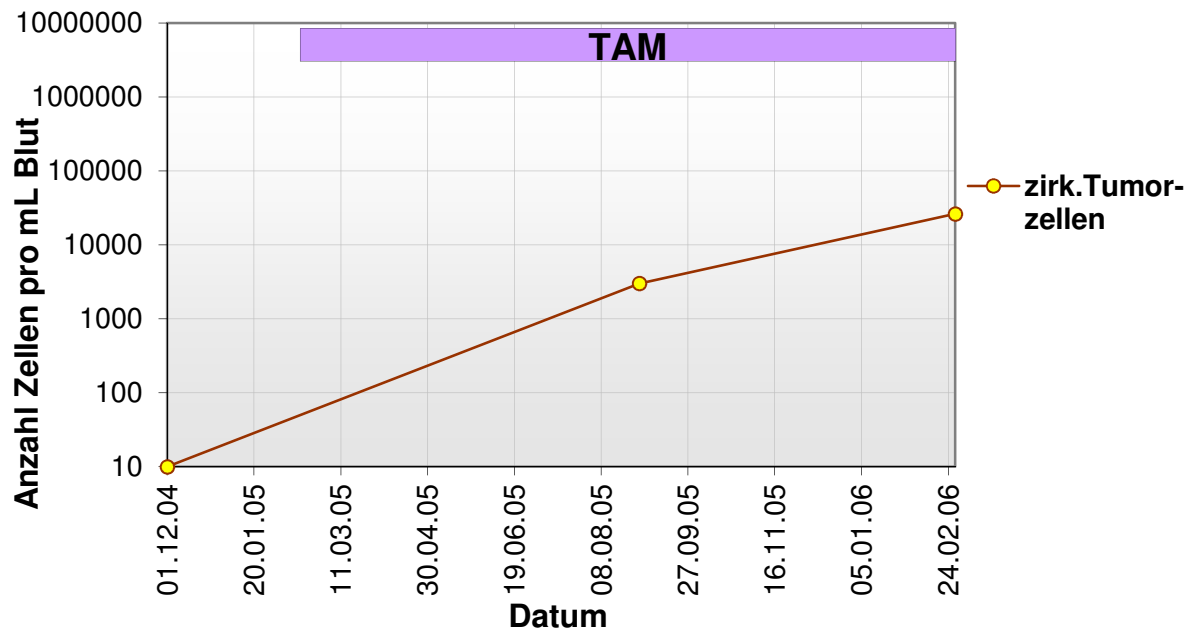


Abb. 7: Zu sehen ist der Anstieg der zirkulierenden Tumorzellen. Die X-Achse zeigt die Zeitspanne (zweimonatiger Abstand); die Y-Achse zeigt die gemessene Zellzahl im Blut. Im oberen Bereich der Abbildung sieht man den Zeitraum, in dem die Patientin eine Tamoxifentherapie erhielt (TAM=Tamoxifen).

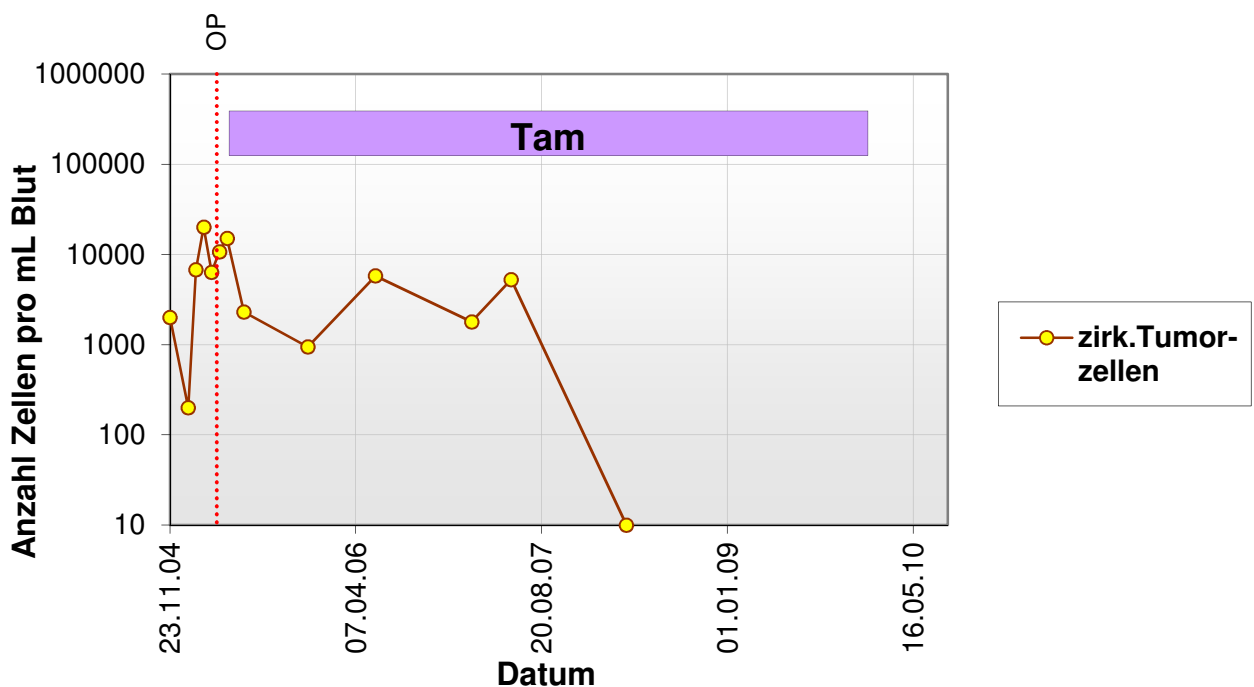


Abb. 8: In dieser Abbildung würde man den gezeigten Graphen als fallend beschreiben. Die X-Achse stellt die Zeitachse, die Y-Achse die gemessene Zellzahl dar. Im oberen Bereich sieht man den Zeitraum, in dem die Patientin unter Tamoxifentherapie stand (Tam).

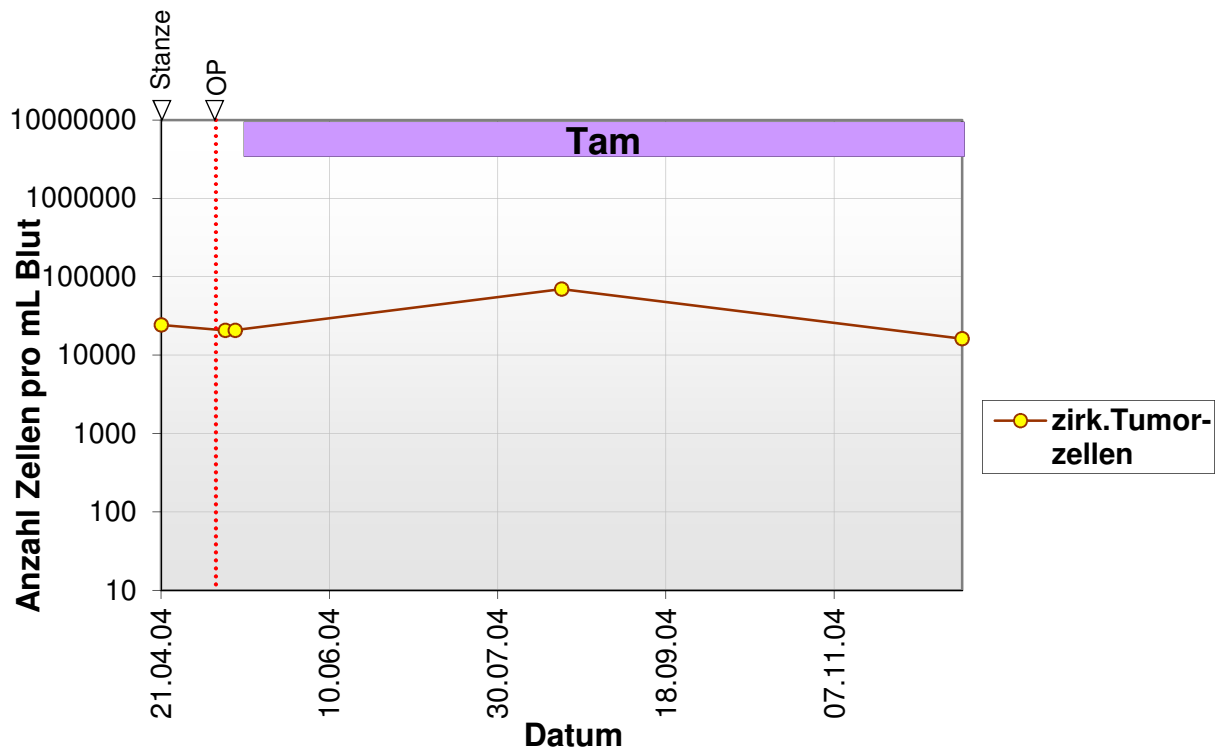


Abb. 9: Exemplarisch soll hier ein als konstanter Verlauf der zirkulierenden Tumorzellen gewerteter Graph dargestellt werden. Die X-Achse stellt ein Zeitintervall von ca. 6 Monaten dar und die Y-Achse zeigt die gemessene Zellzahl zirkulierender Tumorzellen im Blut. Die Patientin hatte während einer Tamoxifentherapie (im oberen Kästchen durch „Tam“ dargestellt) annähernd konstante Zellzahlen.

5.2 Tamoxifen

Tabelle 6 zeigt das Kollektiv aller Patientinnen, die mit Tamoxifen behandelt wurden. Es wird ersichtlich, dass es sich um eine, im Rahmen der Krankheitsentität, Normalverteilung handelt. 119 Patientinnen wurden in die Gruppe eingeschlossen. Patientinnen, die ein Rezidiv bzw. Progress bereits vor der Tamoxifen-Therapie erlitten, wurden nicht berücksichtigt.

| Klinische Daten/Prognosefaktoren | absolut | relativ (%) |
|----------------------------------|------------|--------------|
| Geschlecht | | |
| weiblich | 119 | 100,0 |
| männlich | 0 | 0,0 |
| Alter bei ED | | |
| ≤ 50 | 52 | 43,7 |
| > 50 | 67 | 56,3 |
| Tumorgroße | | |
| pT1 | 66 | 55,5 |
| pT2 | 44 | 37,0 |
| pT3 | 1 | 0,8 |
| pT4 | 6 | 5,0 |
| pTx | 2 | 1,7 |
| Lymphknotenbefall | | |
| pN0 | 76 | 63,9 |
| pN1 | 37 | 31,1 |
| pN2 | 3 | 2,5 |
| pN3 | 2 | 1,7 |
| pNx | 1 | 0,8 |
| Metastasierung | | |
| M0 | 119 | 100,0 |
| M1 | 0 | 0,0 |
| Tumorgrading | | |
| G1 | 10 | 8,4 |
| G2 | 41 | 34,5 |
| G3 | 56 | 47,1 |
| Gx | 12 | 10,1 |
| HER2/neu-Status | | |
| negativ | 86 | 72,3 |
| positiv | 33 | 27,7 |
| Hormonrezeptorstatus | | |
| positiv | 119 | 100 |
| negativ | 0 | 0 |
| Total | 119 | 100,0 |

Tab. 6: Gesamtpatientenkollektiv der Tamoxifen-Gruppe.

5.2.1 Gesamtpatientenkollektiv Tamoxifen

Zunächst wurden alle Patientinnen, die Tamoxifen erhielten, (also sowohl Tamoxifen-Monotherapie, als auch Therapieswitch auf einen Aromataseinhibitor nach Beendigung der Tamoxifentherapie) zusammengefasst. Diese Gruppe enthält 119 Patientinnen.

In dieser Gruppe wurde das Verhalten der Zahl CETC unter der Tamoxifentherapie zum Zeitpunkt des Auftretens eines Rezidivs im gesamten Krankheitsverlauf korreliert.

| CETC_unter_ Tamoxifen | Total N | N of Events | Censored | |
|--------------------------|------------|-------------|----------|---------|
| | | | N | Percent |
| Anstieg | 30 | 9 | 21 | 70,0% |
| Abfall | 56 | 15 | 41 | 73,2% |
| konstant | 33 | 10 | 23 | 69,7% |
| Overall | 119 | 34 | 85 | 71,4% |

Tab. 7: Kreuztabelle Tamoxifen gesamt: Insgesamt 34 der Patientinnen, die Tamoxifen erhielten, erlitten ein Rezidiv. Davon erlittenen 9 Patientinnen, die einen Anstieg der Zellzahl hatten, 15 Patientinnen, die einen Abfall der Zellzahl hatten und 10 Patientinnen mit einem konstanten Zellzahlverlauf unter Tamoxifen, ein Rezidiv.

| | Chi-Square | df | Sig. |
|-----------------------|------------|----|------|
| Log Rank (Mantel-Cox) | ,341 | 2 | ,843 |

Test of equality of survival distributions for the different levels of CETC_unter_Tamoxifen.

Tab. 8: Darstellung der Signifikanz unter Tamoxifen: Das Signifikanzniveau bei der Betrachtung der CETC-Verläufe von Patientinnen unter Tamoxifen, liegt bei $p=0,843$ und ist damit nicht statistisch relevant.

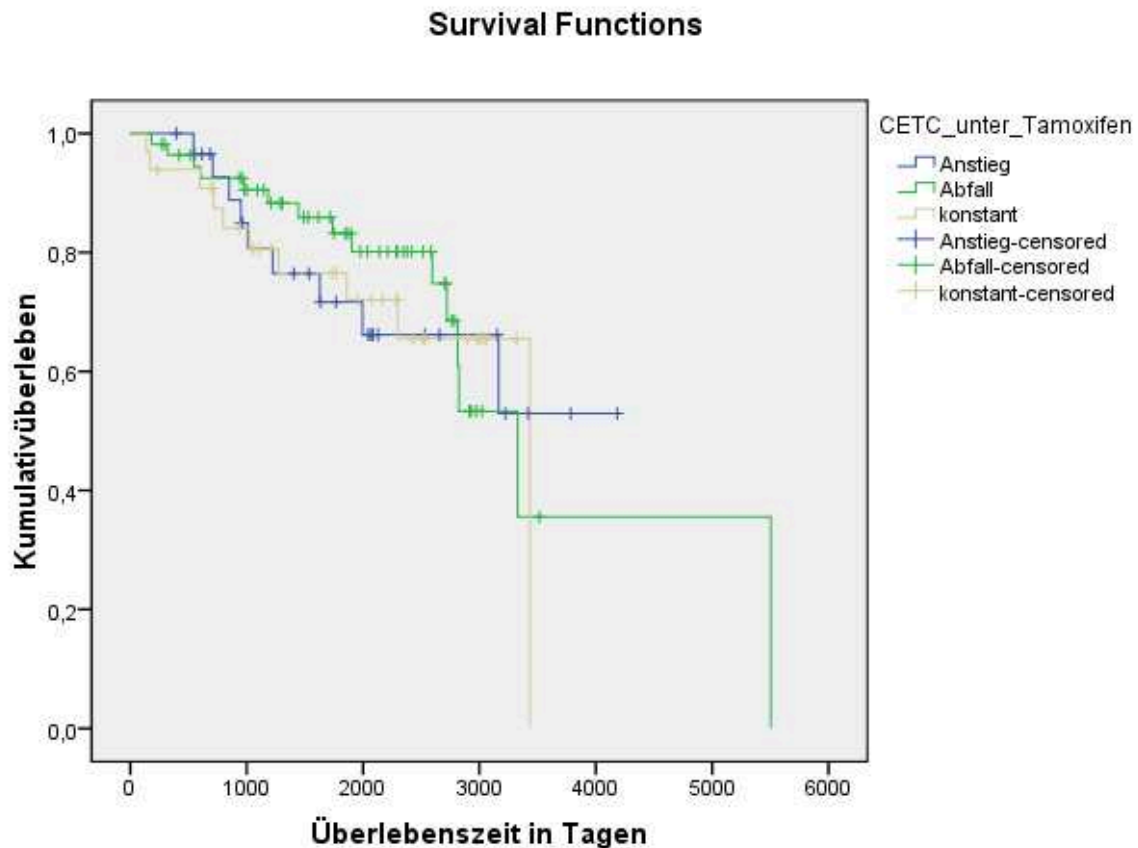


Abb. 10: Kaplan-Meier rezidivfreie Überlebenskurve von allen Patientinnen, die Tamoxifen erhielten. Die Kurve zeigt keinen rezidivfreien Überlebensvorteil für Patientinnen, die unter der Tamoxifen-Therapie einen Abfall der Zellzahlen haben.

34 der 119 Patientinnen, die Tamoxifen entweder als Monotherapie oder vor dem Wechsel zu einem Aromatasehemmer (switch-Therapie) erhielten, erlitten ein Rezidiv (Tab. 7).

Aus der Kaplan-Meier-Überlebenskurve (Abb. 10) geht hervor, dass für Patientinnen, die Tamoxifen erhielten insgesamt kein rezidivfreier Überlebensvorteil besteht, wenn diese Patientinnen unter der Tamoxifentherapie einen Abfall der Zellzahlen aufwiesen.

Dies ergibt sich auch aus dem Signifikanzniveau in der Tabelle 8 von $p=0,843$.

Das bedeutet demzufolge, dass eine Prognoseabschätzung für alle Brustkrebspatientinnen gemeinsam, die Tamoxifen als Monotherapie und/oder vor einem Wechsel auf einen Aromataseinhibitor erhielten, allein auf Grund des Verhaltens der CETC unter Tamoxifen nicht möglich ist. Aus der Kaplan-Meier-Überlebenskurve wird jedoch ersichtlich, dass

Patientinnen mit einem Abfall der CETC-Zahlen in den ersten 5 Jahren länger rezidivfrei überleben zu scheinen.

Da es sich dabei aber um ein inhomogenes Patientenkollektiv handelt, das heißt, dass ein Teil der Patientinnen im Anschluss an die Tamoxifentherapie einen Aromatasehemmer erhielten, der die Prognose verändert haben kann, wurden nachfolgend die einzelnen Therapieformen (also Mono- und switch-Therapie) getrennt voneinander betrachtet.

5.2.2 Tamoxifen-Monotherapie

Bei dem Patientenkollektiv der Tamoxifen-Monotherapie handelt es sich um 66 Patientinnen, welche im Untersuchungszeitraum (siehe Kapitel 4.1.) Tamoxifen über 5 Jahre als Monotherapie erhielten. Die Patientinnen, die einen Therapiewechsel auf einen Aromataseinhibitor nach 2-3 Jahren erhielten, wurden also nicht mit betrachtet. Es wurden sowohl Patientinnen, die Tamoxifen über 5 Jahre erhielten, als auch Patientinnen, die Tamoxifen über einen geringeren Zeitraum erhielten, dann aber keine weitere Hormontherapie angeschlossen wurde, betrachtet.

| CETC unter Tamoxifen | Total N | N of Events | Censored | |
|----------------------------|---------|-------------|----------|---------|
| | | | N | Percent |
| Anstieg | 12 | 6 | 6 | 50,0% |
| Abfall | 29 | 8 | 21 | 72,4% |
| konstant | 25 | 3 | 22 | 88,0% |
| Overall | 66 | 17 | 49 | 74,2% |

Tab. 9: Kreuztabelle Tamoxifen-Monotherapie: Zusammenfassung des Patientenkollektivs von Patientinnen, die nur Tamoxifen erhielten, 17 der 66 Patientinnen erlitten ein Rezidiv ("event").

| | Chi-Square | df | Sig. |
|-----------------------|------------|----|------|
| Log Rank (Mantel-Cox) | 5,984 | 2 | ,050 |

Test of equality of survival distributions for the different levels of CETC unter Tamoxifen.

Tab. 10: Darstellung der Signifikanz unter Tamoxifen-Monotherapie: Das Signifikanzniveau beträgt $p=0,05$, womit sich eine statistische Signifikanz ergibt.

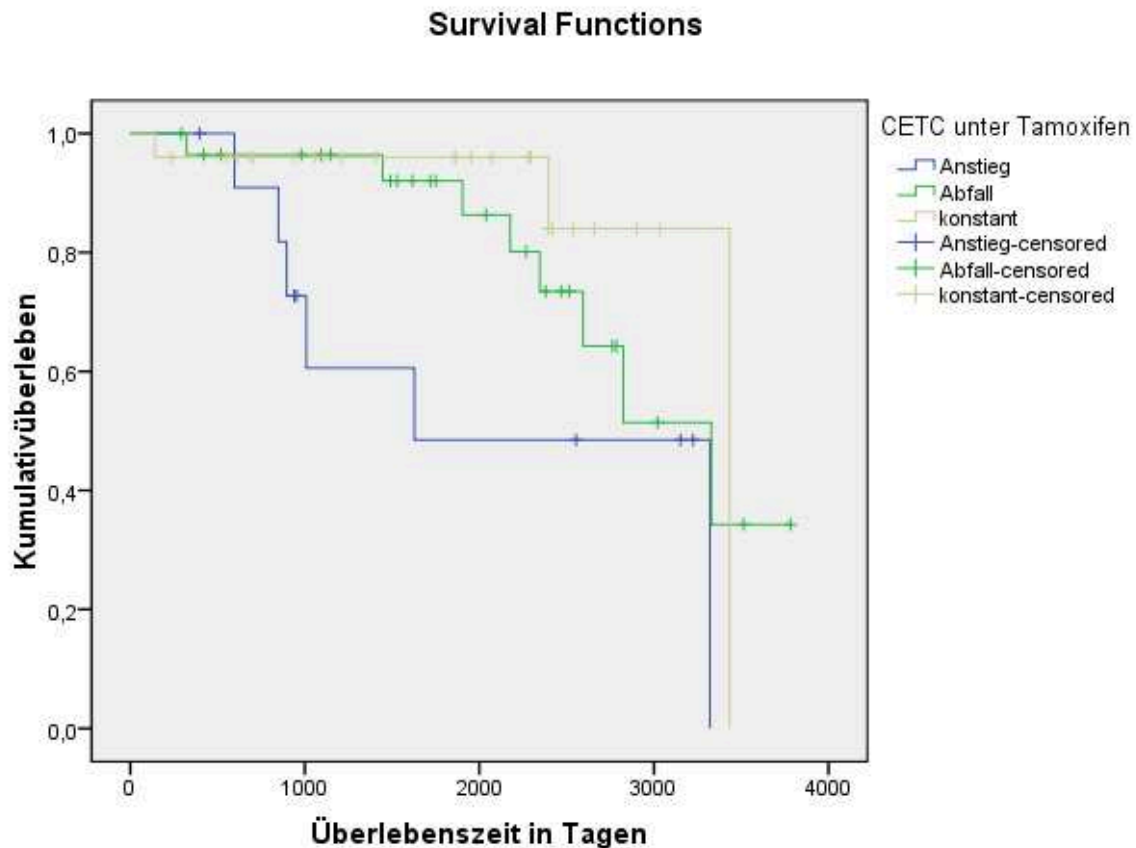


Abb. 11: Die Kaplan-Meier-Überlebenskurve zeigt, dass Patientinnen, die einen Abfall der CETC-Zahlen unter der Tamoxifen-Monotherapie haben, einen Vorteil im rezidivfreien Überleben gegenüber den Patientinnen haben, die einen Anstieg der CETC-Zahlen haben.

Unter den betrachteten 66 Patientinnen erlitten 17 ein Rezidiv. 6 Rezidive sind in der Gruppe der Patientinnen mit einem Anstieg der CETC-Zahlen zu verzeichnen, 8 Rezidive finden sich in der Gruppe der Patientinnen mit einem Abfall der Zellzahlen und 3 Patientinnen rezidierten in der Gruppe der Patientinnen mit einem konstanten Verhalten der CETC-Zahlen (Tab. 9).

Die Kaplan-Meier-Überlebenskurve (Abb. 11) zeigt, dass Patientinnen, die ein Abfall der Zellzahl der zirkulierenden Tumorzellen unter Tamoxifen oder nur gering variierende Zellzahlen hatten, einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber den Patientinnen hatten, die unter der gleichen Therapie einen Anstieg der Zellzahlen der zirkulierenden Tumorzellen hatten (Signifikanzniveau $p=0,05$; Tab. 10). Dies gilt vor allem in den ersten 10 Jahren. Das bedeutet, dass für Brustkrebspatientinnen, die eine Tamoxifenmonotherapie erhielten, eine Prognoseabschätzung anhand der CETC-Verläufe unter Tamoxifen möglich ist.

Noch deutlicher wird dies, wenn man die Patientinnen, die einen konstanten Zellzahlverlauf aufwiesen, zusammen in der Gruppe mit den Patientinnen, die einen Abfall der Zellzahlen unter Tamoxifenmonotherapie hatten, betrachtet.

| | Chi-Square | df | Sig. |
|-----------------------|------------|----|------|
| Log Rank (Mantel-Cox) | 5,492 | 1 | ,019 |

Test of equality of survival distributions for the different levels of CETC_unter_Tamoxifen.

Tab. 11: Darstellung der Signifikanz unter Tamoxifen-Monotherapie (Abfall und konstanter CETC-Verlauf zusammen).

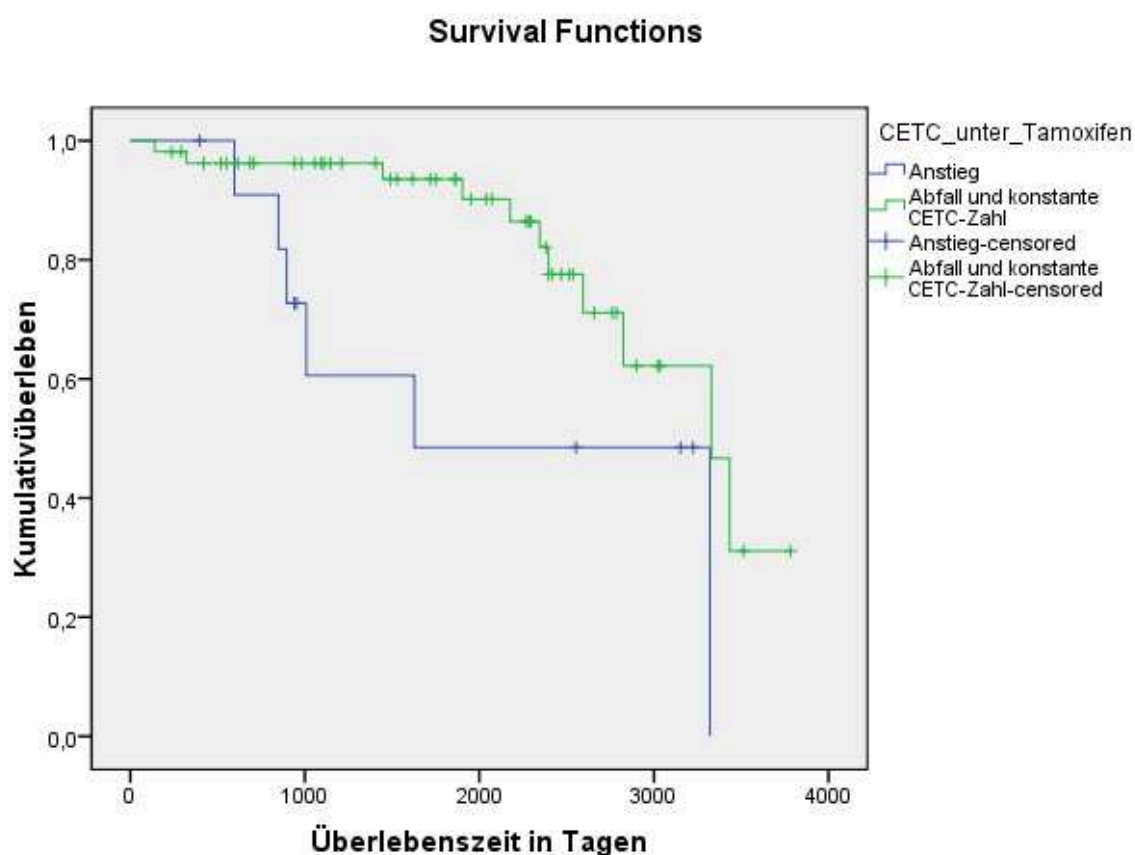


Abb. 12: Die Kaplan – Meier – rezidivfreie - Überlebenskurve in der Gruppe der Patientinnen, die eine Tamoxifenmonotherapie erhielten (Zusammenfassung der Patientinnen, die einen Anstieg und einen konstanten CETC-Verlauf hatten).

Wenn also die Rückfallrate von Patientinnen mit einem Abfall und einem konstanten Verlauf der Zellzahl, in einem Betrachtungsintervall von ca. 10 Jahren zusammengefasst wird,

besteht ein Vorteil für ein rezidivfreies Überleben gegenüber den Patientinnen mit ansteigenden CETC (Abb. 12). Dies bedeutet, dass eine Vorhersage des Krankheitsverlaufs bei Patientinnen mit Tamoxifenmonotherapie anhand des Zellverlaufs zirkulierender Tumorzellen möglich ist. Das Signifikanzniveau beträgt $p=0,019$ und zeigt somit eine statistische Signifikanz.

Gleiche Berechnungen sollen nun für die Patientinnen folgen, die einen Therapieswitch auf einen Aromataseinhibitor erhielten.

5.2.3 Verhalten der CETC unter Tamoxifentherapie vor Therapiewechsel auf einen Aromataseinhibitor und rezidivfreies Gesamtüberleben

In dieser Gruppe wurden 53 Patientinnen untersucht, die im Anschluss an die Therapie mit Tamoxifen einen Aromataseinhibitor erhielten. Es wurden nur Patientinnen, die ein Rezidiv unter Tamoxifen oder später hatten, berücksichtigt. Bei Auftreten eines Rezidivs vor der Tamoxifentherapie, wurden die Patientinnen nicht eingeschlossen. Zuerst wurde das Verhalten der CETC im Untersuchungszeitraum unter Tamoxifen bis zum Ende der Tamoxifen-Therapie betrachtet und zum rezidivfreien Überleben insgesamt (also Rezidiv unter Tamoxifen oder danach) korreliert.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wird auf die CETC-Kinetik unter Aromatasehemmern detaillierter eingegangen.

| CETC_unter_Tamoxifen | Total N | N of Events | Censored | |
|-------------------------|---------|-------------|----------|---------|
| | | | N | Percent |
| Anstieg | 16 | 6 | 10 | 62,5% |
| Abfall | 23 | 7 | 16 | 69,6% |
| konstanter CETC-Verlauf | 14 | 7 | 7 | 50,0% |
| Overall | 53 | 20 | 33 | 62,3% |

Tab. 12: Kreuztabelle Tamoxifen vor switch auf Aromatasehemmer: 53 Patientinnen wurden insgesamt eingeschlossen, wovon 20 Patientinnen ein Rezidiv erlitten. 16 Patientinnen hatten einen Anstieg der Zellzahl, 23 einen Abfall und 14 hatten eine konstante Zellzahl unter der Tamoxifentherapie.

| | Chi-Square | df | Sig. |
|-----------------------|------------|----|------|
| Log Rank (Mantel-Cox) | 2,566 | 2 | ,277 |

Test of equality of survival distributions for the different levels of CETC_unter_Tamoxifen.

Tab. 13: Darstellung der Signifikanz bei Tamoxifen vor switch auf Aromatasehemmer: Bei der Betrachtung des Verhaltens der Zellzahlen von Patientinnen unter Tamoxifentherapie, die anschließend einen Therapiewechsel auf einen Aromatasehemmer erhielten, ergibt sich ein Signifikanzniveau von $p=0,277$.

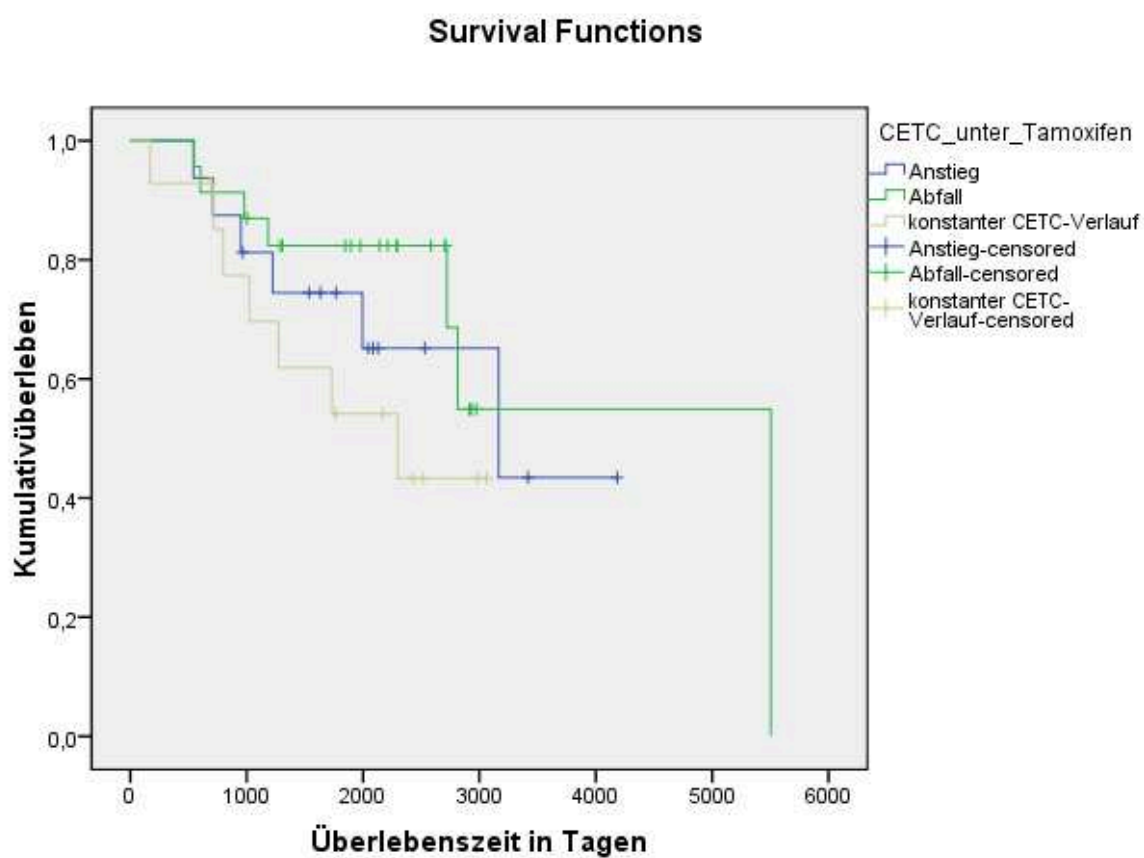


Abb. 13: Kaplan – Meier - Überlebenskurve in der Gruppe der Patientinnen, die eine Anschlussstherapie mit einem Aromataseinhibitor nach der Tamoxifentherapie hatten. Betrachtung jeweils nur der Zellverläufe unter Tamoxifentherapie.

Von den 53 Patientinnen erlitten insgesamt 20 ein Rezidiv (Tab. 12). Der Untersuchungszeitraum beträgt ca. 15 Jahre (Abb. 13).

Abbildung 13 zeigt, dass sich die Kurven innerhalb der ersten 1000 Tage nahezu überlagern. Danach zeigt die Kurve der Patientinnen mit einem Abfall der CETC-Zahlen einen Vorteil gegenüber der Patientinnen, die einen Anstieg der Zellzahlen hatten. Nach ca. 3000 Tagen (ca. 8 Jahre) nähern sich die Kurven allerdings wieder an.

Es ergibt sich ein Signifikanzniveau von $p=0,277$ (Tab. 13). Die errechneten Daten sind also nicht statistisch signifikant.

Eine Prognoseabschätzung der Brustkrebspatientinnen, die Tamoxifen vor einem Therapieswitch auf einen Aromataseinhibitor erhielten, anhand der Kinetik der zirkulierenden Tumorzellen unter Tamoxifen ist demzufolge anscheinend nicht möglich.

5.2.4 Verhalten der CETC unter Tamoxifentherapie vor Therapiewechsel auf einen Aromataseinhibitor und rezidivfreies Überleben unter Tamoxifen

In diesem Kapitel sollen alle Patientinnen, die Tamoxifen vor den Wechsel auf einen Aromatasehemmer bekamen betrachtet werden sowie deren Zellverlauf unter Tamoxifentherapie. Es wurden nur Messungen unter der Tamoxifentherapie berücksichtigt, auch wenn das tatsächliche Einnahmeintervall länger war. Bei drei Patientinnen hat keine CETC-Messung im Tamoxifenintervall stattgefunden, weshalb diese aus der Gruppe ausgeschlossen wurden. Somit wurden 50 Patientinnen insgesamt eingeschlossen, wovon 8 ein Rezidiv unter Tamoxifen hatten (Tab. 14).

| CETC_unter_Tamoxifen | Total N | N of Events | Censored | |
|-------------------------|---------|-------------|----------|---------|
| | | | N | Percent |
| Anstieg | 15 | 3 | 12 | 80,0% |
| Abfall | 23 | 3 | 20 | 87,0% |
| konstanter CETC-Verlauf | 12 | 2 | 10 | 83,3% |
| Overall | 50 | 8 | 42 | 84,0% |

Tab. 14: Kreuztabelle mit Tamoxifen mit switch auf Aromatasehemmer (Betrachtung des Zeitraumes nur unter Tamoxifen): Die Tabelle zeigt, dass insgesamt 50 Patientinnen der Gruppe angehören, wovon sich 42 während der Tamoxifentherapie im klinischen Remissionsstadium befanden.

| | Chi-Square | df | Sig. |
|-----------------------|------------|----|------|
| Log Rank (Mantel-Cox) | ,270 | 2 | ,874 |

Test of equality of survival distributions for the different levels of CETC_unter_Tamoxifen.

Tab. 15: Darstellung der Signifikanz bei Tamoxifen vor switch auf Aromatasehemmer (Betrachtung des Zeitraumes nur unter Tamoxifen): In der Gruppe der Patientinnen, die Tamoxifen vor dem Wechsel auf einen Aromatasehemmer erhielten, ergibt sich bei der Betrachtung der zirkulierenden Tumorzellen während dieses Zeitraumes keine statistische Signifikanz ($p=0,874$).

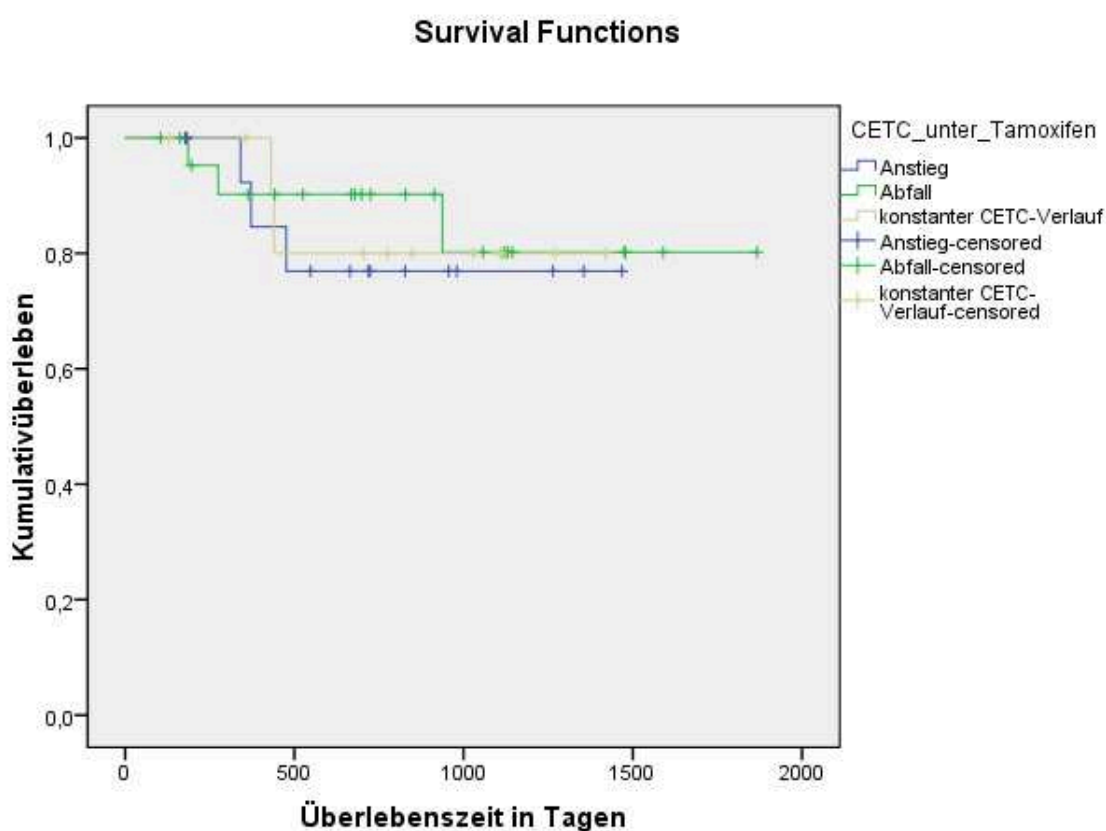


Abb. 14.: Zu sehen ist die Kaplan – Meier – rezidivfreie - Überlebenskurve der Patientinnen, die Tamoxifen vor Therapiewechsel auf einen Aromataseinhibitor erhielten.

Es zeigt sich, dass man anhand des Verlaufes der zirkulierenden Tumorzellen unter Tamoxifentherapie in der kurzen Zeit vor Wechsel auf einen Aromatasehemmer keine statistisch signifikanten Vorhersagen bezüglich des Krankheitsverlaufes treffen kann. Wie in Tabelle 15 erkennbar, beläuft sich die Signifikanz auf $p=0,874$. Dies wird auch aus den Kaplan-Meier-Überlebenskurven (Abb. 14) ersichtlich, welche sich kreuzen.

5.2.5 Therapievergleich Tamoxifen-Monotherapie vs. Tamoxifen vor switch auf einen Aromataseinhibitor

Um beurteilen zu können, ob Patientinnen, die einen Therapiewechsel zu einem Aromatasehemmer erhielten, einen Vorteil gegenüber Patientinnen, die eine Tamoxifen-Monotherapie erhielten, haben, wurden die Therapieregime verglichen. Hierfür wurden Patientinnen, die den Therapiewechsel aufgrund eines Rezidivs erhielten, nicht berücksichtigt. Außerdem wurden Patientinnen, die ein Rezidiv bzw. Progress vor der Tamoxifentherapie erlitten, ausgeschlossen.

| Anschluss therapie | Total N | N of Events | Censored | |
|--------------------------|---------|-------------|----------|---------|
| | | | N | Percent |
| keine Anschluss therapie | 62 | 11 | 51 | 82,3% |
| Aromatasehemmer | 43 | 9 | 34 | 79,1% |
| Overall | 105 | 20 | 85 | 81,0% |

Tab. 16: Kreuztabelle Therapievergleich Tamoxifen-Monotherapie vs. Tamoxifen vor switch: Abgebildete Kreuztabelle zeigt, dass insgesamt 105 Patientinnen eingeschlossen wurden.

| | Chi-Square | df | Sig. |
|-----------------------|------------|----|------|
| Log Rank (Mantel-Cox) | ,137 | 1 | ,711 |

Test of equality of survival distributions for the different levels of Anschluss therapie.

Tab. 17: Darstellung der Signifikanz bei Therapievergleich Tamoxifen-Monotherapie vs. Tamoxifen vor switch auf einen Aromatasehemmer: Das errechnete Signifikanzniveau ergibt $p=0,711$.

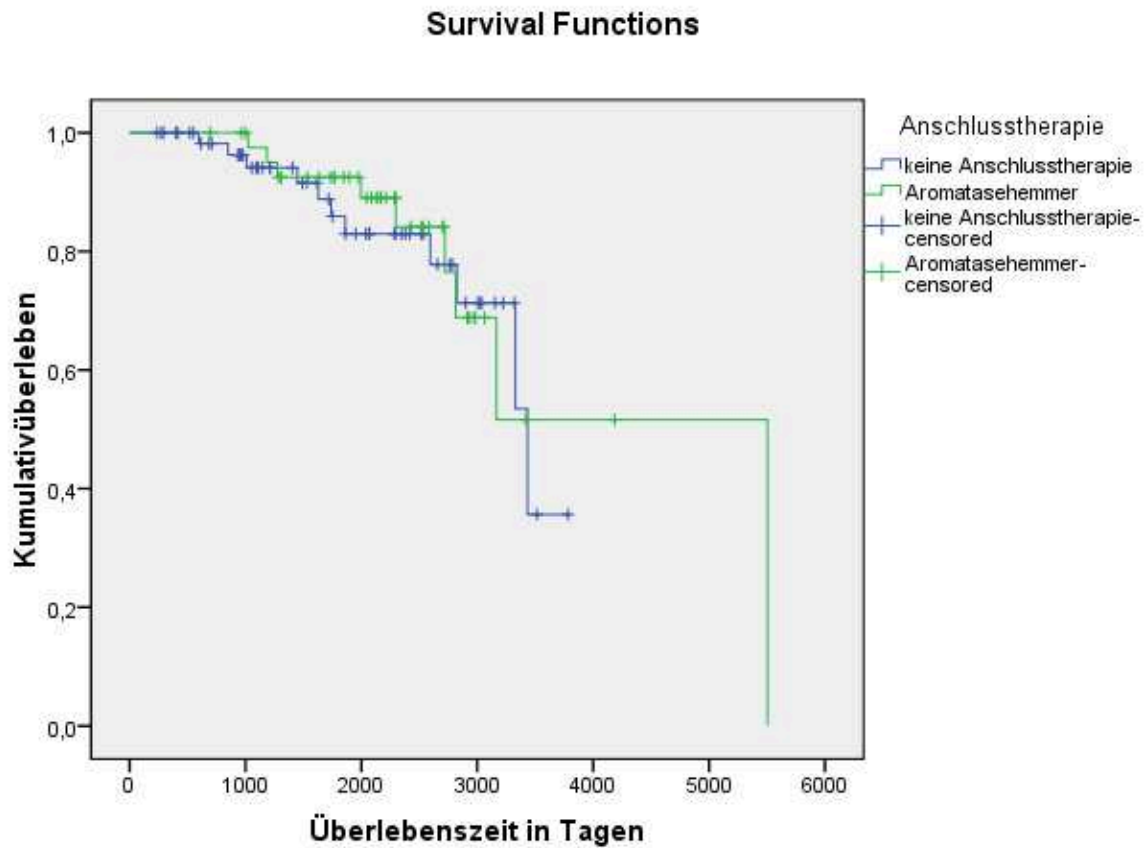


Abb. 15: Kaplan – Meier - Kurve die eine nahezu Überlagerung der beiden Kurven zeigt, was bedeutet, dass beide Therapierregime als gleichwertig zu betrachten sind.

Die Daten schließen 105 Patientinnen ein, von denen 62 eine Tamoxifentherapie und 43 eine Anschlusstherapie an die Tamoxifeneinnahme mit Aromatasehemmern erhielten (Tab. 16).

Die gezeigten Überlebenskurven überlagern sich nahezu. Das bedeutet, dass sich in unserem Patientinnenkollektiv keine Therapieform vorteilhaft gegenüber der anderen erwies (Abb. 15). Dies spiegelt sich ebenfalls im Signifikanzniveau ($p=0,711$) wider (Tab. 17).

Das bedeutet, dass in unserem Patientenkollektiv kein Vorteil im rezidivfreien Überleben der Patientinnen, die einen Therapieswitch auf einen Aromataseinhibitor erhielten, zu verzeichnen ist.

Nachfolgend sollen die CETC-Verläufe unter der Therapie mit den drei gängigen Aromatasehemmern betrachtet werden.

5.3 Exemestan

Zuerst soll auf den Aromataseinhibitor Exemestan eingegangen werden. Insgesamt werden wurden in dieses Patientenkollektiv 52 Patientinnen eingeschlossen, von denen 44,2% der Patientinnen eine fortgeschrittene Tumorgroße aufwiesen (Tab. 18).

| Klinische Daten/Prognosefaktoren | absolut | relativ (%) |
|----------------------------------|-----------|--------------|
| Geschlecht | | |
| weiblich | 52 | 100,0 |
| männlich | 0 | 0,0 |
| Alter bei ED | | |
| ≤ 50 | 13 | 23,6 |
| > 50 | 39 | 76,4 |
| Tumorgroße | | |
| pT1 | 24 | 46,2 |
| pT2 | 20 | 38,5 |
| pT3 | 2 | 3,8 |
| pT4 | 1 | 1,9 |
| pTx | 5 | 9,6 |
| Lymphknotenbefall | | |
| pN0 | 24 | 46,2 |
| pN1 | 16 | 30,8 |
| pN2 | 4 | 7,7 |
| pN3 | 2 | 3,8 |
| pNx | 6 | 11,5 |
| Metastasierung | | |
| M0 | 52 | 100,0 |
| M1 | 0 | 0,0 |
| Tumorggrading | | |
| G1 | 1 | 1,9 |
| G2 | 19 | 36,5 |
| G3 | 26 | 50,0 |
| Gx | 6 | 11,5 |
| HER2/neu-Status | | |
| negativ | 42 | 80,8 |
| positiv | 10 | 19,2 |
| Total | 52 | 100,0 |

Tab. 18: Gesamtpatientenkollektiv der Exemestan-Gruppe.

5.3.1 Gesamtpatientenkollektiv Exemestan

Das betrachtete Patientenkollektiv schließt alle Patientinnen ein, die Exemestan erhielten. Dies umfasst insgesamt 52 Patientinnen. Der Betrachtungszeitraum wurde wiederum vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zum Zeitpunkt des Rezidivs bzw. bis zur letzten Blutentnahme gewählt. In diesem Zusammenhang soll darauf hingewiesen werden, dass es sich um Zeiträume bis zu 30 Jahren handelt.

| CETC_unter_Exemestan | Total N | N of Events | Censored | |
|-------------------------|---------|-------------|----------|---------|
| | | | N | Percent |
| Anstieg | 20 | 9 | 11 | 55,0% |
| Abfall | 19 | 4 | 15 | 78,9% |
| konstanter CETC-Verlauf | 13 | 3 | 10 | 76,9% |
| Overall | 52 | 16 | 36 | 69,2% |

Tab. 19: Kreuztabelle Gesamtpatientenkollektiv Exemestan: Es wurden 52 Patientinnen erfasst, von denen insgesamt 16 ein Rezidiv erlitten.

| | Chi-Square | df | Sig. |
|-----------------------|------------|----|------|
| Log Rank (Mantel-Cox) | 2,085 | 2 | ,353 |

Test of equality of survival distributions for the different levels of CETC_unter_Exemestan.

Tab. 20: Darstellung der Signifikanz bei Betrachtung des Gesamtpatientenkollektives unter Exemestan.

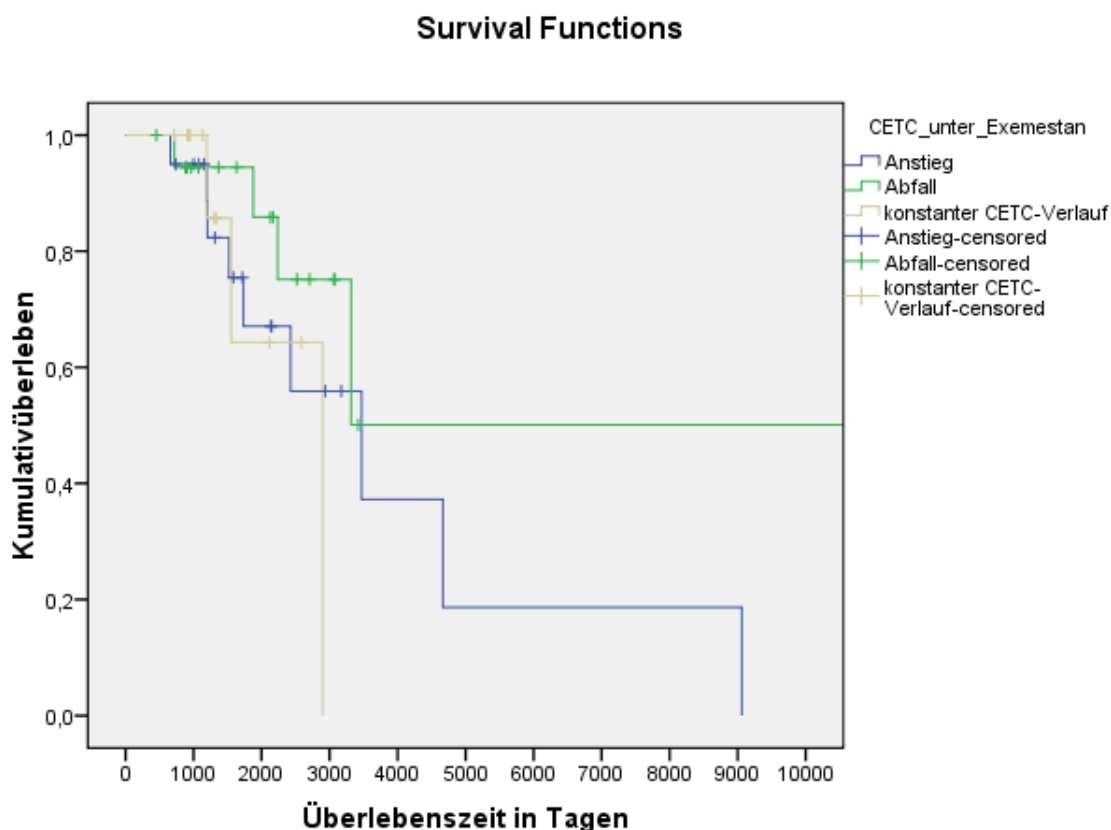


Abb. 16: Kaplan-Meier-Überlebenskurve, die eine nahezu Überlagerung der Kurven zeigt. Keine der betrachteten Gruppen scheint also einen Vorteil im rezidivfreien Überleben zu haben.

Bei diesen 52 Patientinnen waren die Gruppen, in denen die Patientinnen einen Anstieg und einen Abfall der CETC-Zahlen haben, in etwa gleich groß; nur die Gruppe, in der die Patientinnen einen konstanten Zellzahlverlauf haben ist mit 13 Patientinnen etwas kleiner (Tab. 19).

Wie aus der Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abbildung 16 ersichtlich wird, überlagern sich die Kurven fast, sodass die Patientinnen in der Exemestan-Gruppe, die einen Abfall der Zellzahlen haben, keinen Vorteil im rezidiv- oder progressionsfreien Überleben zu haben scheinen. Dies zeigt auch das Signifikanzniveau von $p=0,353$ (Tab. 20).

Dieses Patientenkollektiv beinhaltet aber auch die Patientinnen, die eine andere endokrine Vorthherapie erhielten (siehe Kapitel 5.3.4). Wie an anderer Stelle bereits erwähnt, werden hier vor allem Patientinnen mit sehr fortgeschrittenen Tumorgrößen erfasst.

Der Anschaulichkeit halber wurde die X-Achse nur bis zum Tag 10.000 erfasst. Der Graph „Abfall“ würde noch bis zum 50.000 Tag reichen, da eine Patientin ein solches Überleben aufwies.

In der nachfolgenden Betrachtung wurde dagegen die Gruppe von Patientinnen zusammengefasst, die entweder Exemestan up-front oder Exemestan nach Therapieswitch von Tamoxifen erhielten und somit die Patientinnen mit fortgeschrittener Erkrankung nicht mit einbezogen.

Es wurden insgesamt 34 Patientinnen eingeschlossen. Um größere Gruppen zu erreichen, wurden die Patientinnen, deren Zellzahlen unter Exemestan abfielen und die Patientinnen, deren Zellzahlen konstant blieben, zusammengefasst.

| CETC_unter_Exemestan | Total N | N of Events | Censored | |
|--------------------------------|---------|-------------|----------|---------|
| | | | N | Percent |
| Anstieg | 9 | 4 | 5 | 55,6% |
| Abfall und konstante CETC-Zahl | 25 | 2 | 23 | 92,0% |
| Overall | 34 | 6 | 28 | 82,4% |

Tab. 21: Kreuztabelle bei Exemestan up-front und nach switch von Tamoxifen.

| | Chi-Square | df | Sig. |
|-----------------------|------------|----|------|
| Log Rank (Mantel-Cox) | 3,356 | 1 | ,067 |

Test of equality of survival distributions for the different levels of CETC_unter_Exemestan.

Tab. 22: Darstellung der Signifikanz bei bei Exemestan up-front und nach switch von Tamoxifen.

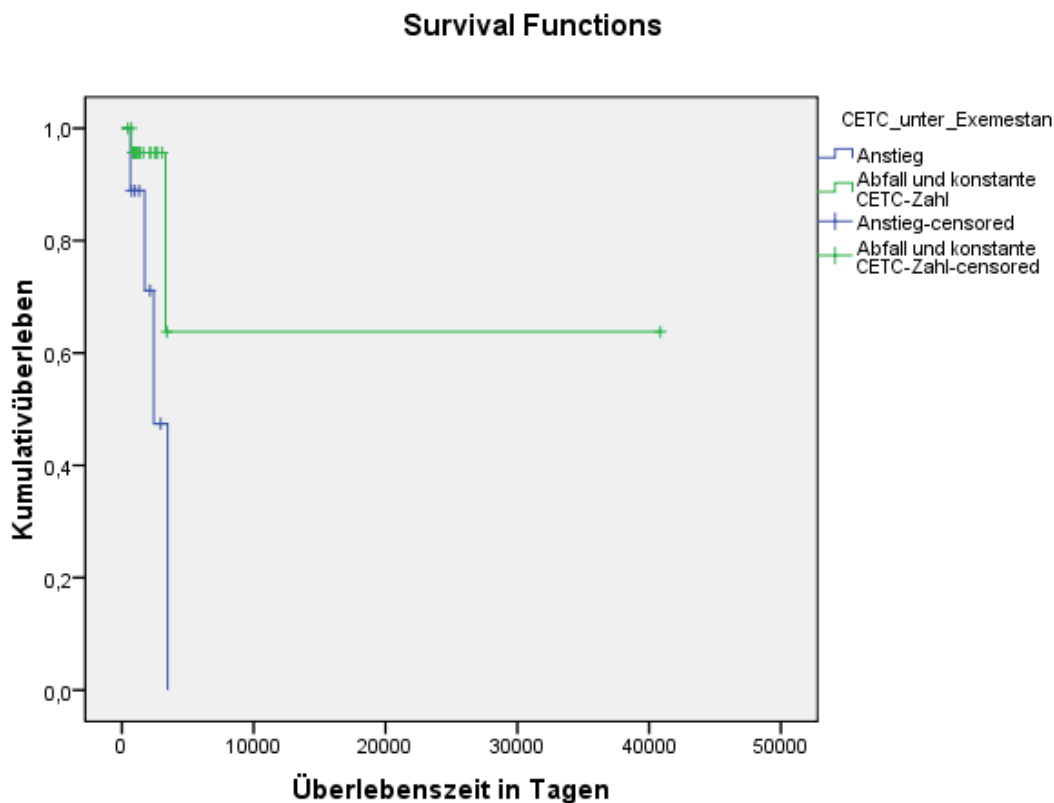


Abb. 17: Kaplan-Meier-rezidivfreie Überlebenskurve für das Kollektiv Exemestan up-front und Exemestan nach Switch von Tamoxifen.

Von den 34 Patientinnen erlitten 6 ein Rezidiv. 4 dieser Patientinnen fanden sich in der Gruppe von Patientinnen, die einen Anstieg der Zellzahlen unter der Exemestantherapie hatten und 2 der Patientinnen mit Rezidiv fanden sich in der Gruppe der Patientinnen, deren Zellzahlen abfielen oder konstant blieben (Tab. 21).

Die Kaplan-Meier-Überlebenskurve (Abb. 17) zeigt tendenziell einen Vorteil der Patientinnen, die einen Abfall der CETC-Zahl bzw. eine konstante CETC-Zahl hatte. Nach ca. 2000 Tagen wird der Vorteil der Gruppe der abfallenden bzw. konstanten CETC-Verläufe ersichtlich. Dies spiegelt sich auch im errechneten Signifikanzniveau von $p=0,067$ wider (Tab. 22).

Es lässt sich also konstatieren, dass bei denjenigen Brustkrebspatientinnen, die einen Abfall bzw. konstanten Verlauf der zirkulierenden Tumorzellen unter Exemestan haben, ein Trend hin zur besseren Prognose besteht.

5.3.2 Exemestan up-front

16 Patientinnen erhielten Exemestan direkt ohne vorher Tamoxifen erhalten zu haben, wovon 2 Patientinnen im Untersuchungszeitraum ein Rezidiv der Erkrankung erlitten. Aufgrund der kleinen Anzahl des Patientenkollektives und bei nur zwei Ereignissen (Rezidiven) in dieser Gruppe, lässt sich in diesem Falle keine Kaplan-Meier-Überlebenskurve erstellen (Tab. 23).

| CETC_unter_Exemestan | Total N | N of Events | Censored | |
|-------------------------|---------|-------------|----------|---------|
| | | | N | Percent |
| Anstieg | 5 | 2 | 3 | 60,0% |
| Abfall | 5 | 0 | 5 | 100,0% |
| konstanter CETC-Verlauf | 6 | 0 | 6 | 100,0% |
| Overall | 16 | 2 | 14 | 87,5% |

Tab. 23: Kreuztabelle Exemestan up-front: Insgesamt gehören 16 Patientinnen dieser Gruppe an, wovon allerdings nur 2 ein Rezidiv erlitten. Beide zeigten einen Anstieg der Zellzahlen. Keine Patientin mit einem Rezidiv hatte einen Abfall oder konstanten Verlauf der Zellzahl, weshalb keine Überlebenskurve oder Signifikanz errechnet werden kann.

5.3.3 Exemestan nach Therapiewechsel von Tamoxifen

Insgesamt 18 Patientinnen erhielten Exemestan als Wechseltherapie nach Tamoxifen. Der Betrachtungszeitraum wurde, wie in allen Kollektiven, die unter Exemestan betrachtet wurden, vom dem Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zum ersten Rezidiv der Erkrankung oder bis zur letzten Probeentnahme gerechnet. Aufgrund der kleinen Größe des Patientenkollektivs wurden die Patientinnen, die unter der Exemestantherapie einen konstanten Verlauf der CETC-Zahlen mit den Patientinnen, die einen Abfall der Zellzahlen hatten, zusammengefasst.

| CETC_unter_Exemestan | Total N | N of Events | Censored | |
|--------------------------------|---------|-------------|----------|---------|
| | | | N | Percent |
| Anstieg | 4 | 2 | 2 | 50,0% |
| Abfall und konstante CETC-Zahl | 14 | 2 | 12 | 85,7% |
| Overall | 18 | 4 | 14 | 77,8% |

Tab. 24: Kreuztabelle Exemestan nach switch von Tamoxifen.

| | Chi-Square | df | Sig. |
|-----------------------|------------|----|------|
| Log Rank (Mantel-Cox) | 2,819 | 1 | ,093 |

Test of equality of survival distributions for the different levels of CETC_unter_Exemestan.

Tab. 25: Darstellung der Signifikanz bei Exemestan nach switch von Tamoxifen: Aus der Berechnung ergibt sich ein Signifikanzniveau von $p=0,093$. Damit lässt sich ein Trend zu einem besseren rezidivfreien Überleben bei Patientinnen mit abfallenden oder konstanten Zellzahlen erkennen.

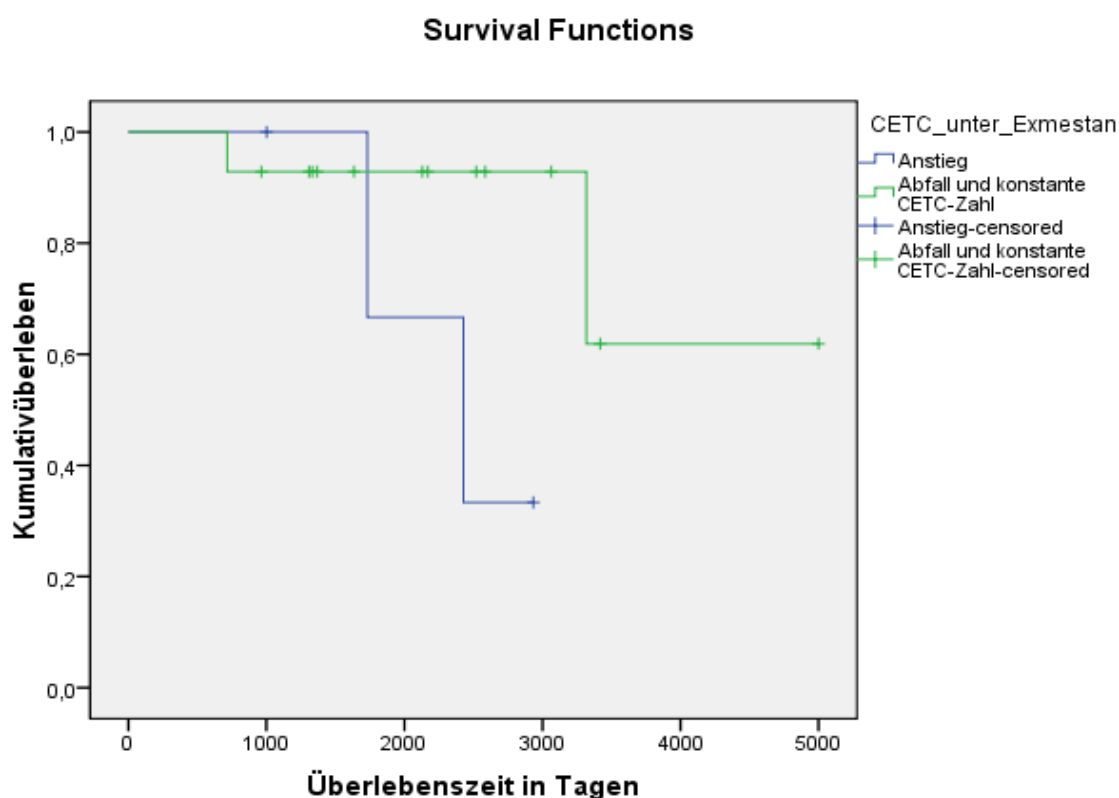


Abb. 18: Kaplan - Meier rezidivfreie Überlebenskurve, die einen Vorteil im rezidivfreien Überleben der Patientinnen mit abfallenden bzw. konstanten Zellzahlen unter Exemestan-Therapie zeigt.

Insgesamt erlitten 4 der 18 eingeschlossenen Patientinnen ein Rezidiv, wobei die jeweilige Anzahl der Rezidive in den beiden Gruppen gleich ist (Tab. 24).

Die zugehörige Kaplan-Meier-Überlebenskurve (Abb. 18) zeigt, dass tendenziell ein Vorteil im rezidivfreien Überleben für die Patientinnen, die einen Abfall bzw. konstanten CETC-Verlauf hatten, in dieser Gruppe auszumachen ist. Vor allem nach 5 Jahren (ca. 2000 Tagen) wird dies deutlich.

Dies wird auch durch das errechnete Signifikanzniveau von $p=0,093$ deutlich (Tab. 25).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass eine Prognoseabschätzung in der Gruppe der Patientinnen, die einen Therapieswitch von Tamoxifen auf Exemestan erhielten, anhand der CETC-Kinetik unter der Exemestantherapie möglich ist.

5.3.4 Exemestan nach anderer endokriner Vorthherapie

Wie bereits beschrieben, wird Exemestan häufig bei Patientinnen eingesetzt, die unter einem reversiblen Aromataseinhibitor rezidivieren, da man sich von Exemestan in diesem Falle ein besseres Therapieansprechen erhofft. Aus diesem Grund wurde eine Gruppe von 18 Patientinnen, deren Therapie von einem reversiblen auf den irreversiblen Aromataseinhibitor Exemestan gewechselt wurde, untersucht.

Bei der Berechnung der Überlebenskurven zeigte sich ein Signifikanzniveau von $p=0,66$ und ergab somit keine statistische Signifikanz. Dabei sollte man beachten, dass die in der Gruppe eingeschlossenen Patientinnen meist in einem sehr fortgeschrittenen Stadium ihrer Erkrankung diese Therapie erhielten. Außerdem handelt es sich wiederum um eine sehr kleine Gruppengröße.

5.4 Anastrozol

Anschließend sollen die Zellverläufe derjenigen Brustkrebspatientinnen betrachtet werden, die Anastrozol erhielten. Der Untersuchungszeitraum bezieht sich auch hier auf den Zeitpunkt der Erstdiagnose bis hin zur letzten Blutentnahme oder bis zum Zeitpunkt des Auftretens eines Rezidivs. Es handelt sich hierbei um 51 Patientinnen mit einer homogenen Verteilung des Alters, Tumorstadiums und der TNM-Klassifikation (Tab. 26).

| Klinische Daten/Prognosefaktoren | absolut | relativ (%) |
|----------------------------------|-----------|--------------|
| Geschlecht | | |
| weiblich | 59 | 100,0 |
| männlich | 0 | 0,0 |
| Alter bei ED | | |
| ≤ 50 | 9 | 15,3 |
| > 50 | 50 | 84,7 |
| Tumorgröße | | |
| pT1 | 34 | 58,8 |
| pT2 | 21 | 37,3 |
| pT3 | 2 | 2,0 |
| pT4 | 2 | 2,0 |
| pTx | 0 | 0,0 |
| Lymphknotenbefall | | |
| pN0 | 34 | 66,7 |
| pN1 | 20 | 29,4 |
| pN2 | 1 | 2,0 |
| pN3 | 0 | 0,0 |
| pNx | 1 | 2,0 |
| Metastasierung | | |
| M0 | 59 | 100,0 |
| M1 | 0 | 0,0 |
| Tumorgrading | | |
| G1 | 2 | 3,9 |
| G2 | 27 | 45,1 |
| G3 | 29 | 49,0 |
| Gx | 1 | 2,0 |
| HER2/neu-Status | | |
| negativ | 44 | 86,3 |
| positiv | 15 | 13,7 |
| Total | 59 | 100,0 |

Tab. 26: Gesamtpatientenkollektiv der Anastrozol-Gruppe.

5.4.1 Gesamtpatientenkollektiv Anastrozol

Um ein größeres Patientenkollektiv betrachten zu können, wurden erneut diejenigen Patientinnen zusammengefasst, die Anastrozol up-front erhielten und die Patientinnen, die Anastrozol nach Tamoxifen erhielten. Es ergibt sich ein Patientenkollektiv von 59 Patientinnen. Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln wurde die Gruppe der Patientinnen mit konstantem Zellverlauf mit der Gruppe der Patientinnen mit einer abfallenden Zellkinetik zusammengefasst.

| CETC_unter_Anastrozol | Total N | N of Events | Censored | |
|--------------------------------|---------|-------------|----------|---------|
| | | | N | Percent |
| Anstieg | 21 | 9 | 12 | 57,1% |
| Abfall und konstante CETC-Zahl | 38 | 8 | 30 | 78,9% |
| Overall | 59 | 17 | 42 | 71,2% |

Tab. 27: Kreuztabelle Gesamtpatientenkollektiv Anastrozol.

| | Chi-Square | df | Sig. |
|-----------------------|------------|----|------|
| Log Rank (Mantel-Cox) | 3,268 | 1 | ,071 |

Test of equality of survival distributions for the different levels of CETC_unter_Anastrozol.

Tab. 28: Darstellung der Signifikanz bei Betrachtung des Gesamtpatientenkollektives unter Anastrozol.

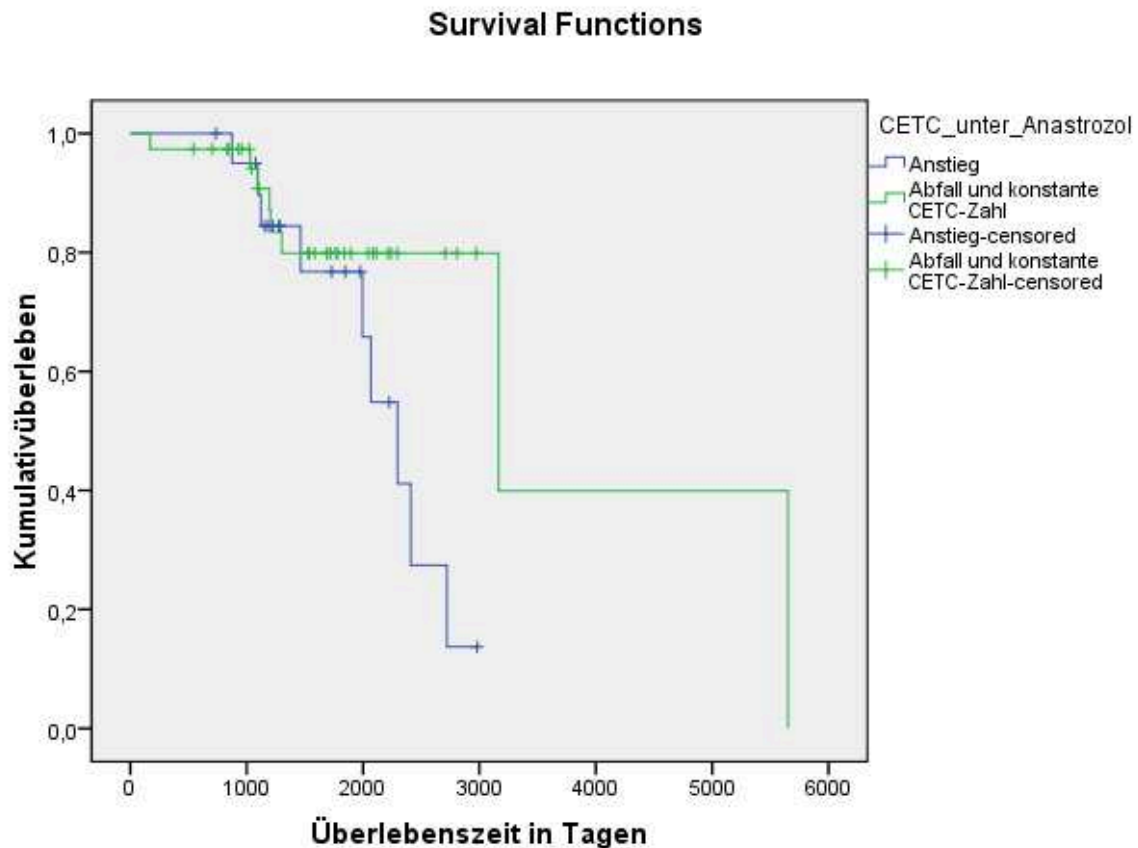


Abb. 19: Kaplan-Meier- rezidivfreie Überlebenskurve zur Darstellung des Gesamtpatientenkollektivs der Patientinnen, die Anastrozol erhielten.

Wie aus Tabelle 27 ersichtlich wird, erlitten 17 der 59 Patientinnen während der Anastrozoltherapie ein Rezidiv. Davon trat das Rezidiv bei 9 Patientinnen in der Gruppe derjenigen Patientinnen auf, die einen Anstieg der CETC-Zahlen hatten und bei 8 Patientinnen der Gruppe, in welcher die ansteigenden und konstanten CETC-Verläufe zusammengefasst wurden.

In der Kaplan-Meier-Überlebenskurve (Abb. 19) überlagern sich die beiden Kurven bis in etwa zum 2000. Tag fast. Allerdings trennen sie sich nach diesen ca. 5 ½ Jahren und es besteht tendenziell ein Überlebensvorteil in der zusammengefassten Gruppe. Dies zeigt auch das aus Tabelle 28 ablesbare Signifikanzniveau von $p=0,071$.

Zusammenfassend besteht in der Gruppe derjenigen Brustkrebspatientinnen, die Anastrozol erhielten, ein Trend hin zu einem Überlebensvorteil, wenn die CETC-Zahl abfällt oder konstant bleibt.

5.4.2 Anastrozol up-front

Nachfolgend wurden die Patientinnen analysiert, die Anastrozol up-front erhielten. Es wurden 32 Patientinnen eingeschlossen. Erneut wurden die Patientinnen, die einen Abfall und die, die einen konstanten Verlauf der Anzahl zirkulierender Tumorzellen hatten, zusammen analysiert.

| CETC_unter_Anastrozol | Total N | N of Events | Censored | |
|--------------------------------|---------|-------------|----------|---------|
| | | | N | Percent |
| Anstieg | 8 | 3 | 5 | 62,5% |
| Abfall und konstante CETC-Zahl | 24 | 4 | 20 | 83,3% |
| Overall | 32 | 7 | 25 | 78,1% |

Tab. 29: Kreuztabelle Anastrozol up-front.

| | Chi-Square | df | Sig. |
|-----------------------|------------|----|------|
| Log Rank (Mantel-Cox) | 1,542 | 1 | ,214 |

Test of equality of survival distributions for the different levels of CETC_unter_Anastrozol.

Tab. 30: Darstellung der Signifikanz bei Anastrozol up-front.

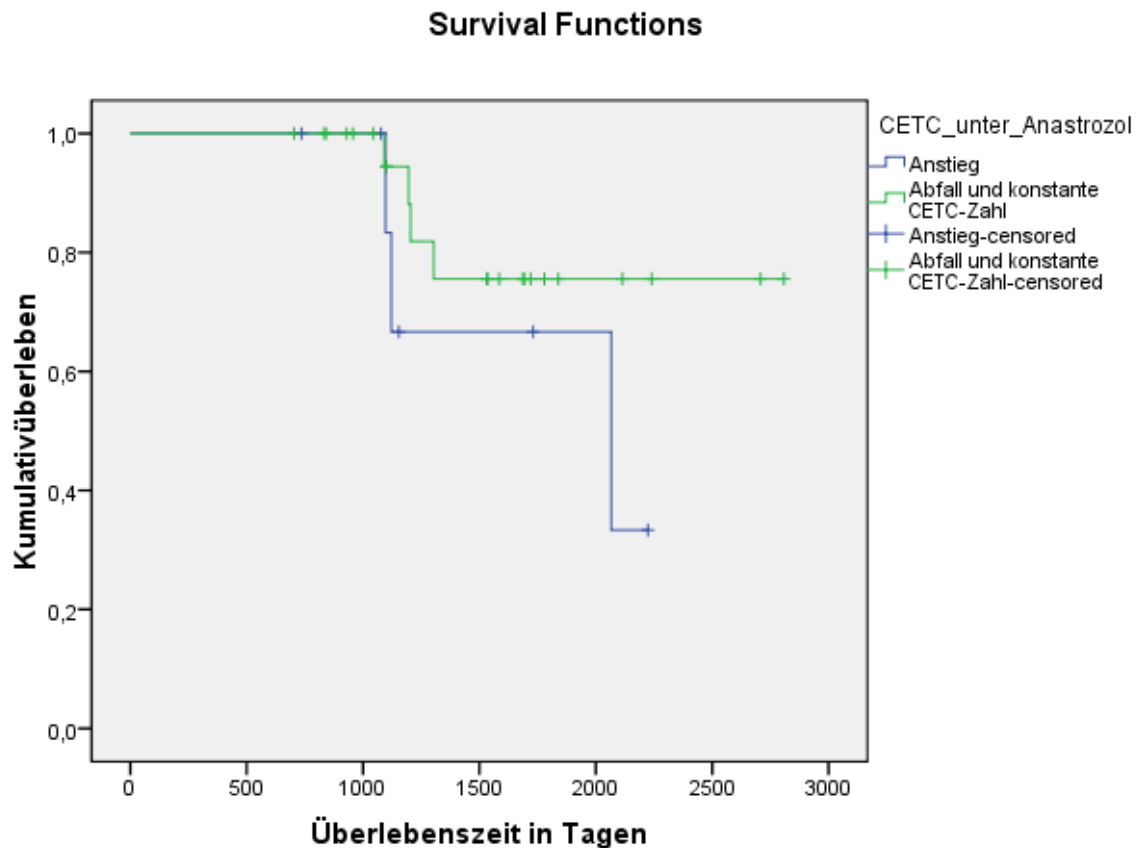


Abb. 20: Kaplan-Meier- rezidivfreie Überlebenskurve der „Anastrozol up-front“- Patientengruppe.

Von den 32 Patientinnen, die Anastrozol up-front erhielten, erlitten 7 Patientinnen ein Rezidiv, wovon 3 in der Gruppe der Patientinnen auftraten, die einen Anstieg der Zellzahlen hatten und 4 in der zusammengefassten Gruppe bestehend aus abfallenden und konstanten CETC-Verläufen (Tab. 29).

Das Signifikanzniveau liegt bei $p=0,214$ der Unterschied ist somit nicht statistisch signifikant (Tab. 30).

Die Kaplan-Meier- rezidivfreie Überlebenskurve (Abb. 20) hierzu zeigt vor allem in den ersten 1000 Tagen (ca. 3 Jahre) eine Überlagerung der beiden Kurven. Es wird aber wiederum nach 1500 Tagen ein „Auseinanderweichen“ beider Kurven und einem etwas schlechterem Outcome der Patientinnen, die einen Zellzahlanstieg unter der Anastrozoltherapie erlitten, deutlich.

Eine Prognoseabschätzung anhand der Kinetik der zirkulierenden Tumorzellen in der Gruppe derjenigen Brustkrebspatientinnen, die Anastrozol up-front erhielten, ist an dem vorliegenden Patientenkollektiv statistisch nicht möglich.

5.4.3 Anastrozol nach Therapiewechsel von Tamoxifen

25 Brustkrebspatientinnen, bei denen nach einer Hormontherapie mit Tamoxifen ein Therapiewechsel auf den Aromatasehemmer Anastrozol erfolgte, wurden im Folgenden betrachtet. Werden die drei Gruppen getrennt voneinander analysiert, so ergibt sich ein Signifikanzniveau von $p=0,205$. Deshalb wurden erneut die Gruppen der Patientinnen, die eine konstante Zellzahl hatten und die einen Abfall der Zellzahl unter Anastrozol hatten, zusammengefasst.

| CETC_unter_Anastrozol | Total N | N of Events | Censored | |
|--------------------------------|---------|-------------|----------|---------|
| | | | N | Percent |
| Anstieg | 13 | 6 | 7 | 53,8% |
| Abfall und konstante CETC-Zahl | 12 | 2 | 10 | 83,3% |
| Overall | 25 | 8 | 17 | 68,0% |

Tab. 31: Kreuztabelle Anastrozol nach switch von Tamoxifen.

| | Chi-Square | df | Sig. |
|-----------------------|------------|----|------|
| Log Rank (Mantel-Cox) | 2,899 | 1 | ,089 |

Test of equality of survival distributions for the different levels of CETC_unter_Anastrozol.

Tab. 32: Darstellung der Signifikanz bei Anastrozol nach switch von Tamoxifen.

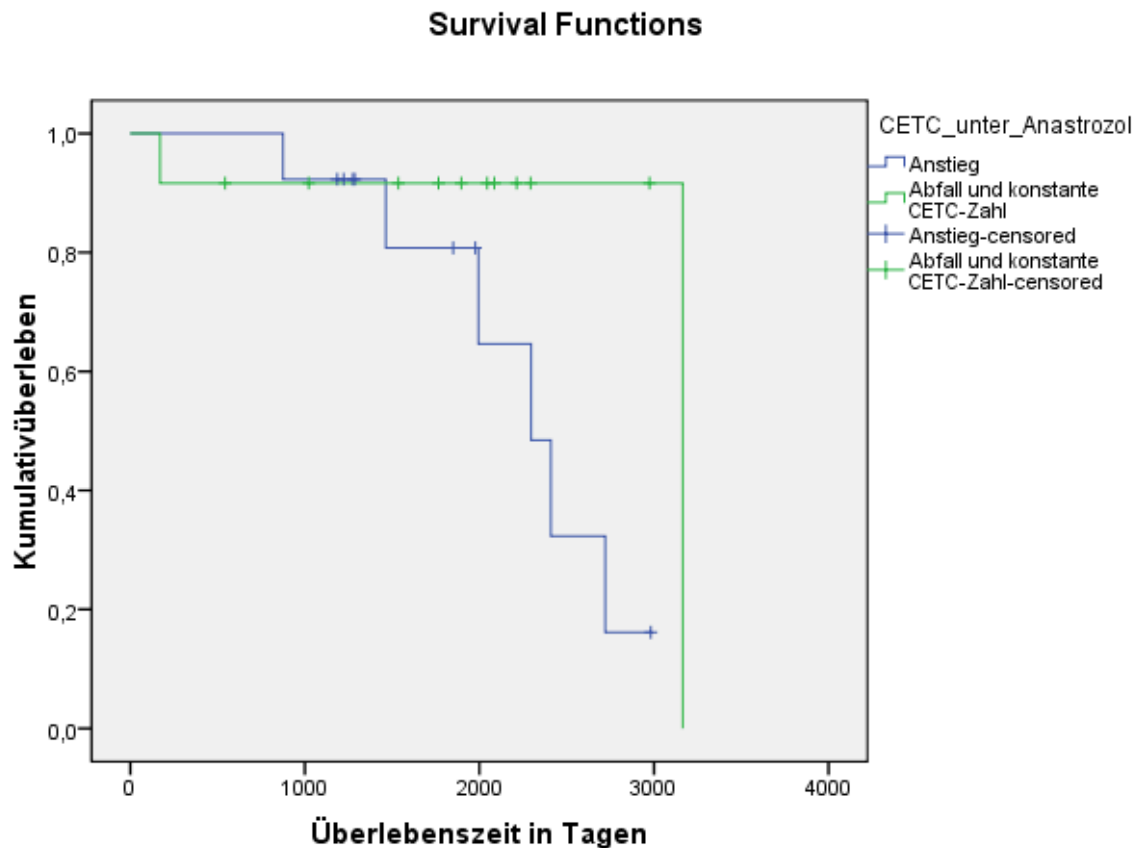


Abb. 21: Kaplan-Meier-Kurve für Patientinnen die von Tamoxifen zu Anastrozol gewechselt haben.

Von den 25 Patientinnen erlitten insgesamt 8 ein Rezidiv, wobei 6 Rezidive in der Gruppe der Patientinnen mit einem Anstieg der Zellzahlen im Verlauf der Anastrozoltherapie auftraten und 2 in der zusammengefassten Gruppe (Tab. 31).

Die Kurven zum rezidivfreien Überleben weichen erst nach den ersten 5 Jahren voneinander ab. Die Kurve der Patientengruppe, in der die Patientinnen mit abfallenden Zellzahlen und die mit konstanten Zellzahlen zusammengefasst sind, hat demzufolge tendenziell einen Vorteil gegenüber der Gruppe der Patientinnen mit ansteigenden Zellzahlen (Abb. 21). Nach ca. 10 Jahren nähern sich die Kurven jedoch wieder an. Dies wird auch aus dem in Tabelle 32 errechneten Signifikanzniveau von $p=0,089$ deutlich.

Es lässt sich demnach folgern, dass ein Trend hin zum besseren Überleben in der Gruppe der Patientinnen besteht, die eine abfallende oder konstante Zellkinetik der zirkulierenden Tumorzellen aufweisen.

5.5 Letrozol

Nachfolgend sollen nun die Zellverläufe derjenigen Patientinnen betrachtet werden, welche den reversiblen Aromatasehemmer Letrozol erhielten. Tabelle 33 zeigt die Zusammenstellung des Patientenkollektivs. Die doch sehr kleine Gruppe ist hinsichtlich TNM-Klassifikation, Tumorgrading und Alter normal verteilt.

| Klinische Daten/Prognosefaktoren | absolut | relativ (%) |
|----------------------------------|-----------|--------------|
| Geschlecht | | |
| weiblich | 28 | 100,0 |
| männlich | 0 | 0,0 |
| Alter bei ED | | |
| ≤ 50 | 10 | 37,0 |
| > 50 | 18 | 63,0 |
| Tumorgroße | | |
| pT1 | 15 | 53,6 |
| pT2 | 10 | 35,7 |
| pT3 | 0 | 0,0 |
| pT4 | 2 | 7,1 |
| pTx | 1 | 3,6 |
| Lymphknotenbefall | | |
| pN0 | 14 | 50,0 |
| pN1 | 10 | 35,7 |
| pN2 | 2 | 7,1 |
| pN3 | 1 | 3,6 |
| pNx | 1 | 3,6 |
| Metastasierung | | |
| M0 | 28 | 100,0 |
| M1 | 0 | 0,0 |
| Tumorgrading | | |
| G1 | 0 | 0,0 |
| G2 | 9 | 32,1 |
| G3 | 17 | 60,7 |
| Gx | 2 | 7,1 |
| HER2/neu-Status | | |
| negativ | 17 | 60,7 |
| positiv | 11 | 39,3 |
| Total | 28 | 100,0 |

Tab. 33: Gesamtpatientenkollektiv der Letrozol-Gruppe.

5.5.1 Gesamtpatientenkollektiv Letrozol

Es wurden diejenigen Patientinnen, die Letrozol up-front erhielten und diejenigen, die Letrozol nach einem Therapiewechsel von Tamoxifen erhielten, zusammengefasst. Somit ergibt sich eine Gruppengröße von 28 Patientinnen.

| CETC_unter_Letrozol | Total N | N of Events | Censored | |
|-------------------------|---------|-------------|----------|---------|
| | | | N | Percent |
| Anstieg | 10 | 6 | 4 | 40,0% |
| Abfall | 11 | 4 | 7 | 63,6% |
| konstanter CETC-Verlauf | 7 | 3 | 4 | 57,1% |
| Overall | 28 | 13 | 15 | 53,6% |

Tab. 34: Kreuztabelle Gesamtpatientenkollektiv Letrozol.

| | Chi-Square | df | Sig. |
|-----------------------|------------|----|------|
| Log Rank (Mantel-Cox) | 15,142 | 2 | ,001 |

Test of equality of survival distributions for the different levels of CETC_unter_Letrozol.

Tab. 35: Darstellung der Signifikanz bei Betrachtung des Gesamtpatientenkollektives unter Letrozol: Berechnetes Signifikanzniveau für alle Patientinnen, die Letrozol erhielten, beträgt $p=0,001$ und ist somit statistisch signifikant.

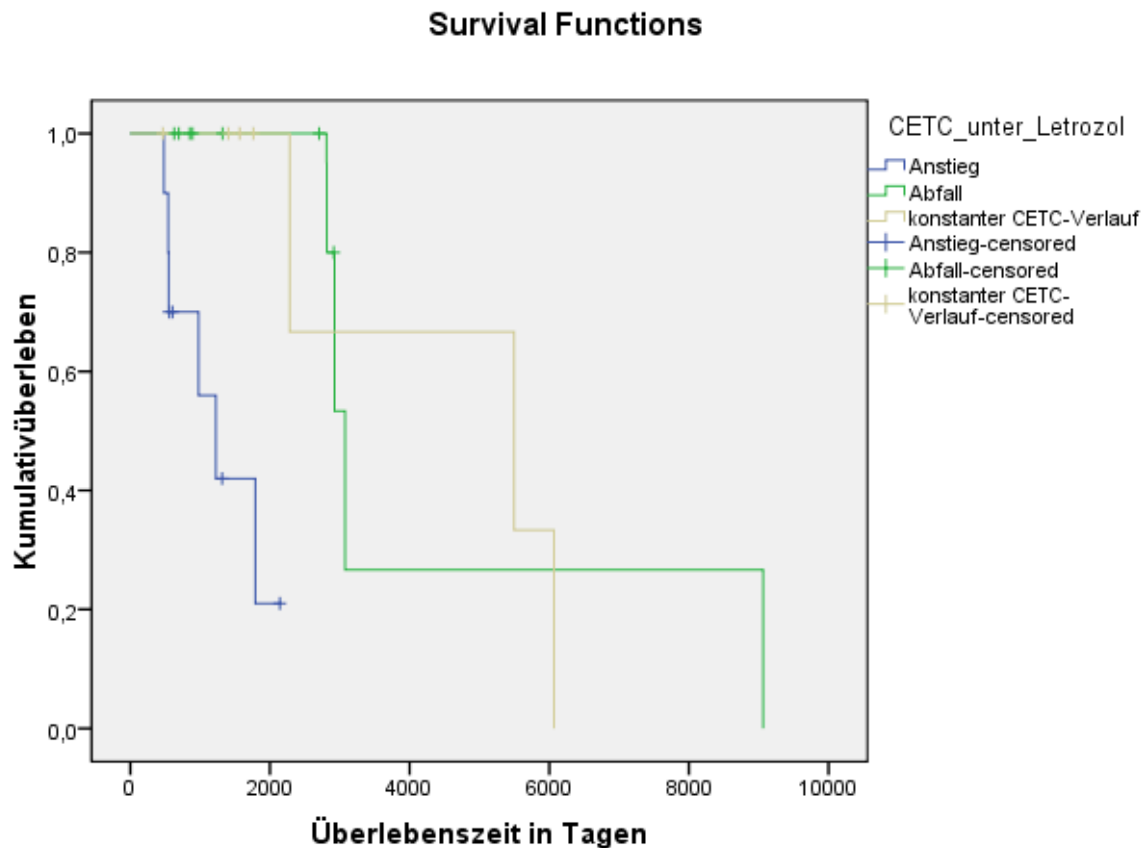


Abb. 22: Kaplan-Meier-rezidivfreie Überlebenskurve bei Betrachtung des Gesamtpatientenkollektives unter Letrozol.

Aus Tabelle 34 geht hervor, dass 13 der eingeschlossenen 28 Patientinnen ein Rezidiv erlitten. Davon waren 6 Patientinnen in der Gruppe mit ansteigenden Zellzahlen betroffen, 4 in der Gruppe mit abfallenden Zellzahlen sowie 3 Patientinnen, deren Verlauf während der Letrozoltherapie konstant blieb.

Die Überlebenskurven zeigen einen signifikanten zeitlichen Vorteil der Patientinnen, deren Zellzahlen während der Letrozoltherapie abfiel (Abb. 22) und dies wird aus dem Signifikanzniveau $p=0,001$ deutlich (Tab. 35).

Eine Prognoseabschätzung derjenigen Patientinnen, die Letrozol erhielten, ist demnach anhand deren Verhalten der Zellzahl möglich ist.

5.5.2 Letrozol up-front

Die Patientinnen, die Letrozol up-front bekamen, machten eine Gruppe von 14 Personen aus. Aufgrund der kleinen Gruppengröße, war es auch hier nicht möglich, eine Kaplan-Meier-Überlebenskurve zu generieren. Daher wurden die Verläufe der Patientinnen, die unter Letrozol einen Abfall der CETC-Zahlen und diejenigen, die einen konstanten Verlauf hatten, zusammengefasst (Tab. 36).

| CETC_unter_ Letrozol | Total N | N of Events | Censored | |
|-------------------------|------------|-------------|----------|---------|
| | | | N | Percent |
| Anstieg | 4 | 1 | 3 | 75,0% |
| Abfall | 10 | 2 | 8 | 80,0% |
| Overall | 14 | 3 | 11 | 78,6% |

Tab. 36: Kreuztabelle Letrozol up-front.

| | Chi-Square | df | Sig. |
|-----------------------|------------|----|------|
| Log Rank (Mantel-Cox) | 2,250 | 1 | ,134 |

Test of equality of survival distributions for the different levels of CETC_unter_Letrozol.

Tab. 37: Darstellung der Signifikanz bei Letrozol up-front.

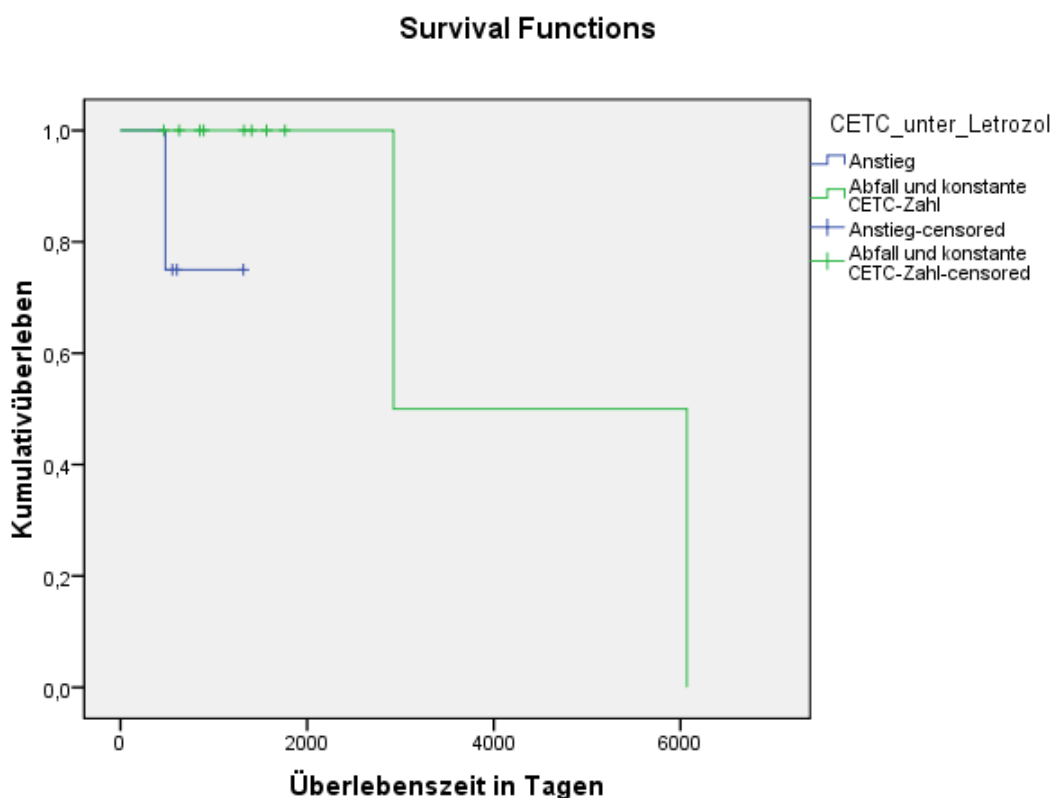


Abb. 23: Kaplan-Meier- rezidivfreie Überlebenskurve der Patientinnen, die Letrozol up-front erhielten.

Es lässt sich anhand der statistischen Auswertung keine Prognose für Patientinnen, die Letrozol up-front erhielten, abschätzen. Es zeigt sich jedoch ein Trend, bei welchem ein Anstieg der zirkulierenden Tumorzellen mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Kaplan-Meier-Überlebenskurve; Abb. 23). Das Signifikanzniveau beträgt $p = 0,13$ (Tab. 37).

Gleicher Sachverhalt wird nachfolgend am Patientenkollektiv untersucht, das Letrozol nach einem Therapiewechsel von Tamoxifen erhielt.

5.5.3 Letrozol nach Therapiewechsel von Tamoxifen

Diese Gruppe enthält ebenfalls 14 Patientinnen. Aufgrund der kleinen Gruppengröße werden erneut die beiden Gruppen der Patientinnen, die einen Abfall der Zellzahlen und diejenigen, die einen konstanten Verlauf hatten, zusammengefasst.

| CETC_unter_Letrozol | Total N | N of Events | Censored | |
|--------------------------------|---------|-------------|----------|---------|
| | | | N | Percent |
| Anstieg | 6 | 5 | 1 | 16,7% |
| Abfall und konstante CETC-Zahl | 8 | 5 | 3 | 37,5% |
| Overall | 14 | 10 | 4 | 28,6% |

Tab. 38: Kreuztabelle Letrozol nach switch von Tamoxifen.

| | Chi-Square | df | Sig. |
|-----------------------|------------|----|------|
| Log Rank (Mantel-Cox) | 9,943 | 1 | ,002 |

Test of equality of survival distributions for the different levels of CETC_unter_Letrozol.

Tab. 39: Darstellung der Signifikanz bei Letrozol von switch auf Tamoxifen.

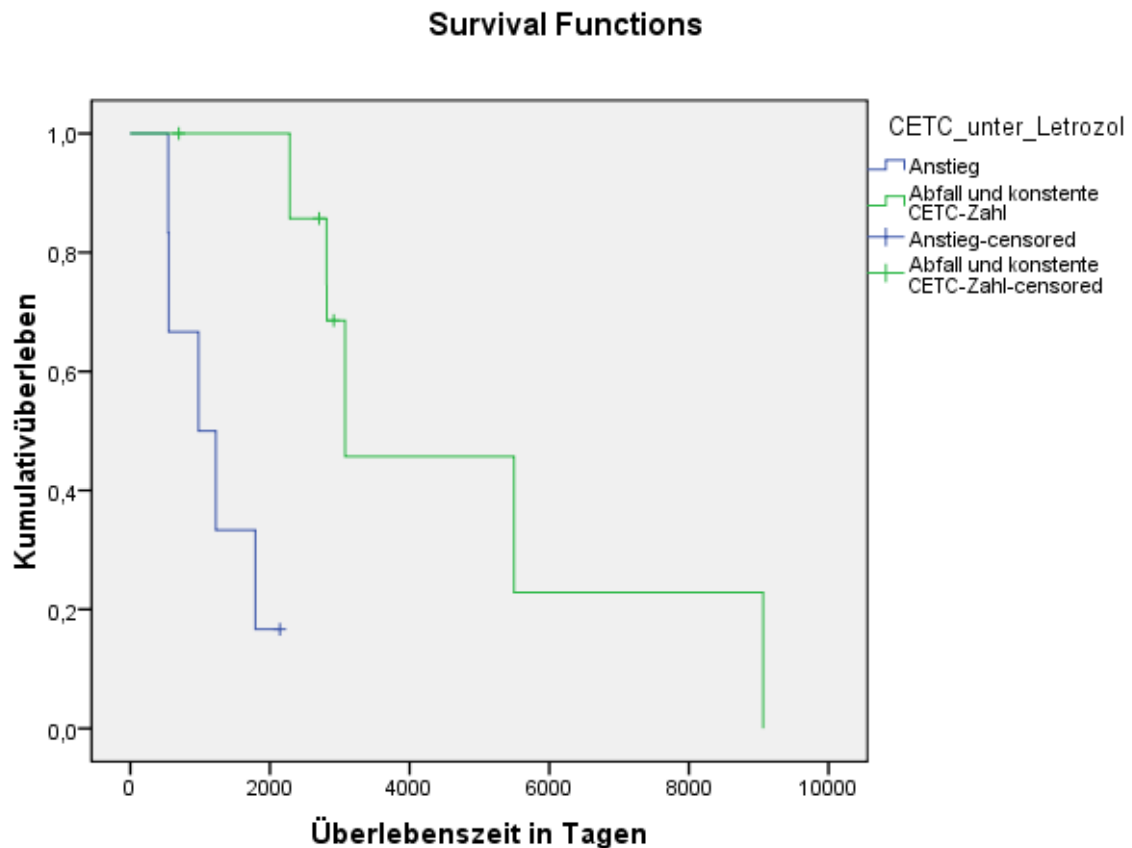


Abb. 24: Kaplan – Meier – rezidivfreie Überlebenskurve bei Letrozol nach switch von Tamoxifen.

10 der 14 Patientinnen erlitten unter Letrozol ein Rezidiv, wobei bei 5 dieser Patientinnen die Zellzahl anstieg und bei 5 Patientinnen ein Rezidiv bei abfallenden bzw. konstanten Zellzahlen auftrat (Tab. 38)

Die Kaplan – Meier - rezidivfreien Überlebenskurven zeigen einen Vorteil in der Überlebenszeit ohne Rezidiv für diejenigen Patientinnen, die eine abfallende bzw. gleich bleibende Zahl zirkulierender Tumorzellen während der Letrozoltherapie hatten (Abb. 24). Dieser Sachverhalt ergibt sich auch aus dem Signifikanzniveau von $p=0,002$ (Tab. 39).

Eine Prognoseabschätzung für Brustkrebspatientinnen, bei denen die Therapie von Tamoxifen zu Letrozol gewechselt wurde, ist also anhand deren CETC-Kinetik statistisch signifikant möglich.

5.6 Therapievergleich steroidale vs. nicht-steroidale Aromatasehemmer

Aufgrund des bereits erwähnten ähnlichen Wirkmechanismus von Anastrozol und Letrozol haben wir die beiden Gruppen zusammengefasst und mit dem Aromatasehemmer Exemestan verglichen. Beide Gruppen enthielten Patientinnen, die den Aromataseinhibitor up-front erhielten. Patientinnen, die zuvor einen anderen Aromataseinhibitor erhielten, wurden in beiden Gruppen nicht berücksichtigt.

5.6.1 Therapievergleich

Um einen Vorteil einer der beiden Therapiestrategien auszuschließen, wurden zuerst beide Therapieansätze anhand der Überlebenszeiten miteinander verglichen. Die Gruppe enthält 62 Patientinnen (Tab. 40).

| Aromatasehemmertherapie | Total N | N of Events | Censored | |
|--------------------------|---------|-------------|----------|---------|
| | | | N | Percent |
| Anastrozol oder Letrozol | 46 | 10 | 36 | 78,3% |
| Exemestan | 16 | 2 | 14 | 87,5% |
| Overall | 62 | 12 | 50 | 80,6% |

Tab. 40: Kreuztabelle Therapievergleich steroidale vs. nicht-steroidale Aromatasehemmer.

| | Chi-Square | df | Sig. |
|-----------------------|------------|----|------|
| Log Rank (Mantel-Cox) | ,134 | 1 | ,714 |

Test of equality of survival distributions for the different levels of Aromatasehemmertherapie.

Tab. 41: Darstellung der Signifikanz bei Therapievergleich steroidale vs. nicht-steroidale Aromatasehemmer.

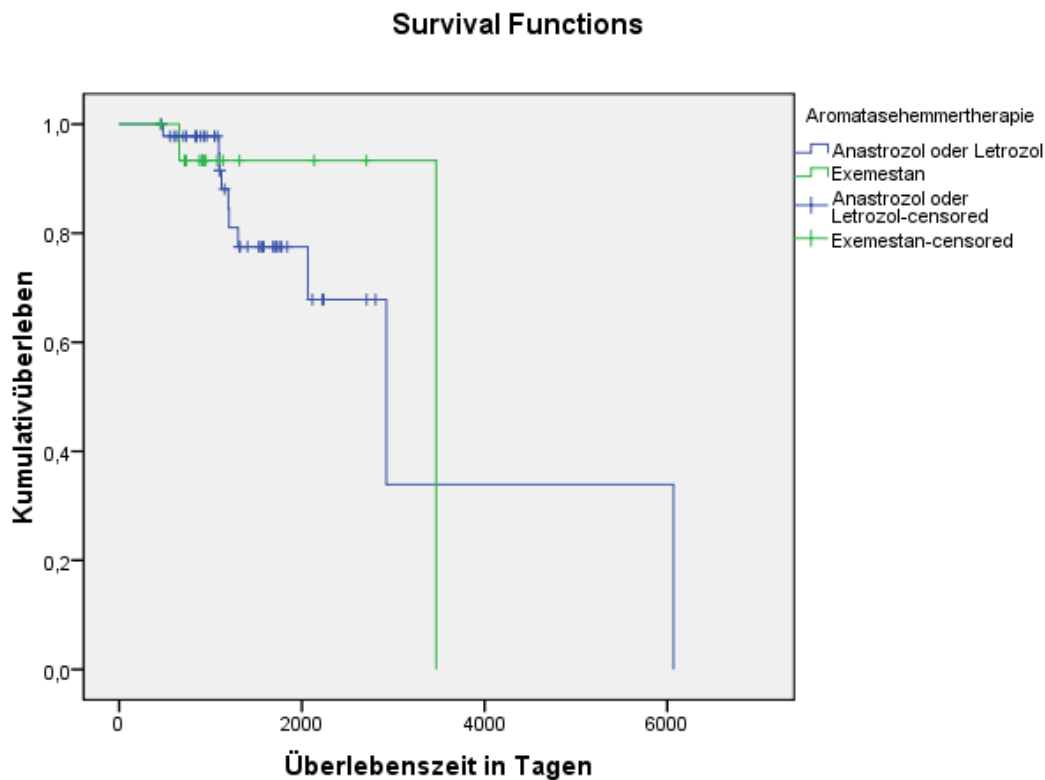


Abb. 25: Kaplan – Meier - Überlebenskurve zum Vergleich Anastrozol und Letrozol vs. Exemestan.

Hinsichtlich der kumulativen rezidivfreien Überlebenszeit besteht, entsprechend der dargestellten Kaplan-Meier-Kurven, zwar kein signifikanter Unterschied zwischen reversiblen und irreversiblen Aromataseinhibitoren. Dennoch scheint die 5-Jahresüberlebensrate bei einer Therapie mit Exemestan, im Vergleich zu einer Therapie mit reversiblen Aromataseinhibitoren, tendenziell besser zu sein. Das Signifikanzniveau beträgt $p=0,714$ (Tab. 41).

5.6.2 CETC-Verläufe der reversiblen Aromatasehemmer ohne Tamoxifentherapie

Diese Gruppe setzt sich aus 46 Patientinnen zusammen, die entweder Anastrozol oder Letrozol up-front erhielten, (Tab. 42). Der Betrachtungszeitraum geht vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zum Zeitpunkt des Rezidivs, insofern dieser während der entsprechenden Aromatasehemmer-Therapie oder danach auftrat. Bei Remission wurde der Zeitpunkt der letzten Probeentnahme als Enddatum gewählt.

| CETC_unter_ Aromatasehemmer- therapie | Total N | N of Events | Censored | |
|---|------------|-------------------|----------|---------|
| | | | N | Percent |
| Anstieg | 12 | 4 | 8 | 66,7% |
| Abfall | 21 | 3 | 18 | 85,7% |
| konstant | 13 | 3 | 10 | 76,9% |
| Overall | 46 | 10 | 36 | 78,3% |

Tab. 42: Kreuztabelle reversible Aromatasehemmer.

| | Chi-Square | df | Sig. |
|-----------------------|------------|----|------|
| Log Rank (Mantel-Cox) | 4,076 | 2 | ,130 |

Test of equality of survival distributions for the different levels of
CETC_unter_Aromatasehemmertherapie.

Tab. 43: Darstellung der Signifikanz bei reversiblen Aromatasehemmern.

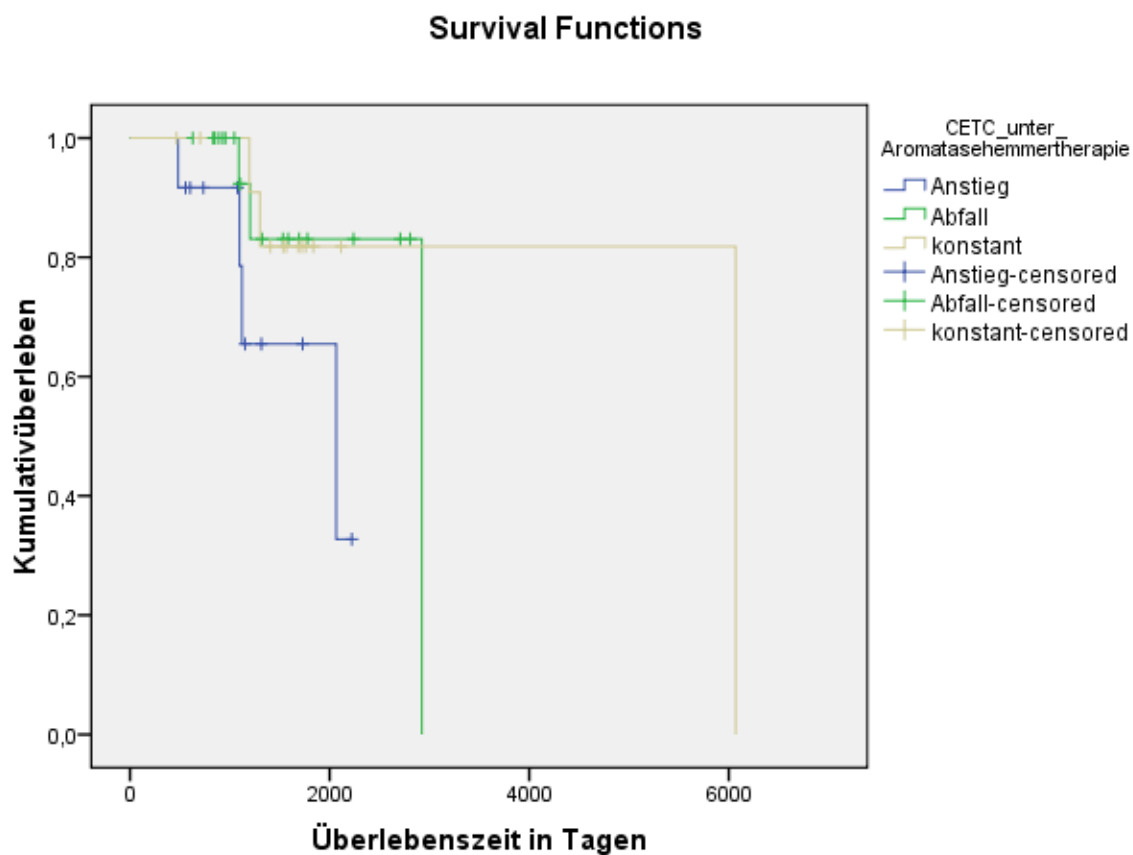


Abb. 26: Kaplan - Meier – Überlebenskurve der reversiblen Aromatasehemmer.

Die CETC-Verläufe unter beiden reversiblen Aromataseinhibitoren zusammen erlauben zwar keine signifikante Prognoseabschätzung, zeigen jedoch wieder einen Trend zu längerem rezidivfreiem Überleben bei Patientinnen, deren Zellzahlen unter der Aromatasehemmertherapie abfallen und bei Patientinnen, deren Zellzahlen unter der Aromatasehemmertherapie konstant blieben (Abb. 26). Das Signifikanzniveau liegt bei $p=0,13$ (Tab. 43).

5.6.3 CETC-Verläufe aller Aromataseinhibitoren

Zusätzlich bezogen wir nun auch Patientinnen in die Berechnung ein, die Exemestan erhielten. Das heißt, dass alle Patientinnen, die einen Aromatasehemmer up-front bekamen, wurden in diese Gruppe eingeschlossen. Dies betraf insgesamt 62 Patientinnen. Die Zellzahlverläufe von abfallenden und konstanten Zellen wurden zunächst zusammengefasst.

| CETC_unter_Aromatasehemmertherapie | Total N | N of Events | Censored | |
|------------------------------------|---------|-------------|----------|---------|
| | | | N | Percent |
| Anstieg | 17 | 6 | 11 | 64,7% |
| Abfall und konstante CETC-Zahl | 45 | 6 | 39 | 86,7% |
| Overall | 62 | 12 | 50 | 80,6% |

Tab. 44: Kreuztabelle Gesamtpatientenkollektiv Aromatasehemmer.

| | Chi-Square | df | Sig. |
|-----------------------|------------|----|------|
| Log Rank (Mantel-Cox) | 3,159 | 1 | ,075 |

Test of equality of survival distributions for the different levels of CETC_unter_Aromatasehemmertherapie.

Tab. 45: Darstellung der Signifikanz bei Betrachtung des Gesamtpatientenkollektives unter Aromatasehemmern: Es ergibt sich ein Signifikanzniveau von $p=0,75$, wodurch sich ein Trend abschätzen lässt.

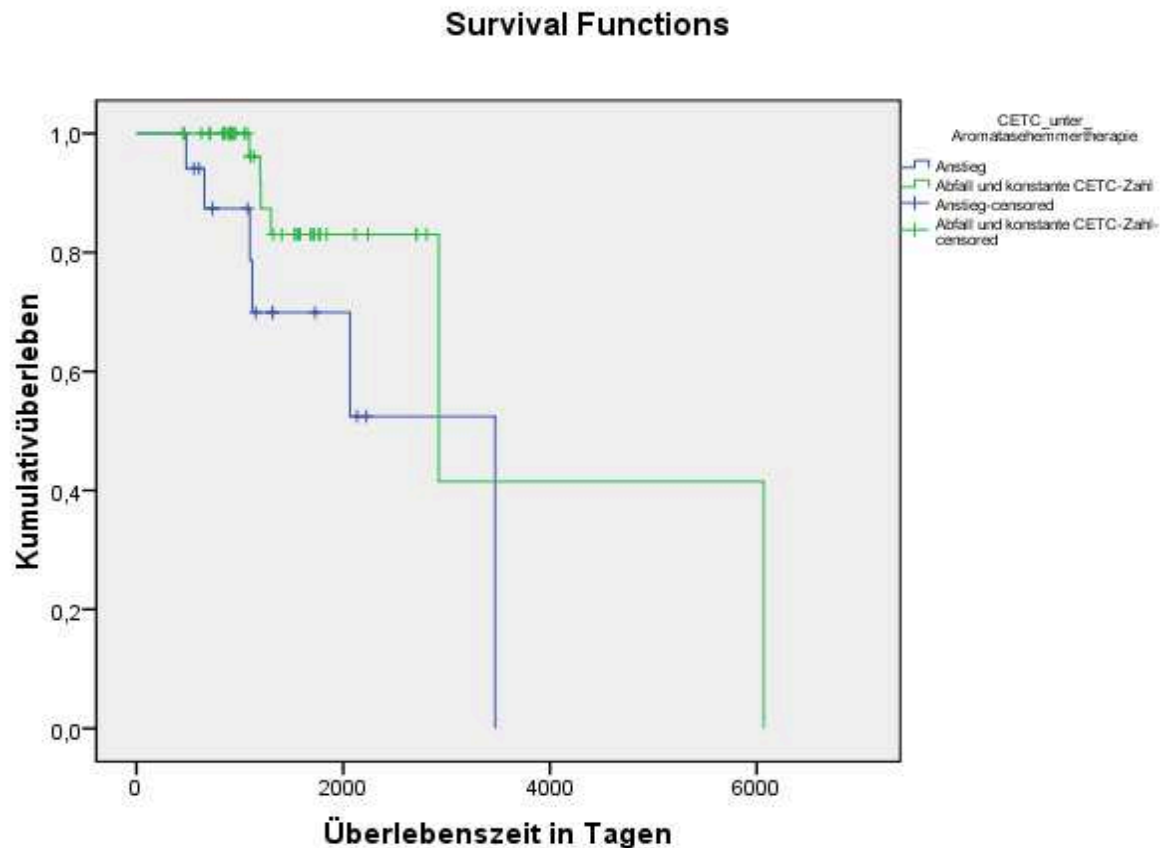


Abb. 27: Rezidivfreie Überlebenskurve für alle Patientinnen, die einen Aromatasehemmer erhielten.

Es wurden, wie aus Tabelle 44 ersichtlich, 62 Patientinnen eingeschlossen, von denen insgesamt 12 Patientinnen ein Rezidiv erlitten. 6 Patientinnen der Gruppe von 17 Patientinnen mit ansteigenden CETC-Zahlen und 6 Patientinnen der zusammengefassten Gruppe, welche mit abfallenden und konstanten CETC-Zahlen enthielt, rezidierten.

Das errechnete Signifikanzniveau beträgt $p=0,075$, woraus sich ein Trend ablesen lässt. Dieser ist auch in der zugehörigen Kaplan-Meier-Überlebenskurve ersichtlich (Abb. 27). In den ersten 8 Jahren zeigt sich ein Überlebensvorteil der zusammengefassten Gruppe. Erst nach ca. 3.000 Tagen (ca. 8 Jahren) kreuzen sich die Kurven. Das bedeutet, dass anhand der CETC-Kinetik tendenziell eine Prognoseabschätzung für Brustkrebspatientinnen unter Therapie mit einem Aromataseinhibitor möglich ist.

Bei der separaten Betrachtung aller drei Gruppen, ergibt sich allerdings nur ein Signifikanzniveau von $p=0,196$. Damit besteht keine statistische Signifikanz (Tab. 45).

6 Diskussion

6.1 Bewertung der Methode

Dieser Abschnitt der Arbeit soll die Vor- und Nachteile der MAINTRAC®-Methode aufzeigen und diese in die Auswahl der vorhandenen Verfahren zur Detektion zirkulierender Tumorzellen einordnen. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, erfolgt bei dieser Methode keine Zellanreicherung, sondern die Zahl der zirkulierenden epithelialen Tumorzellen wird aus den EDTA-Blutproben allein durch Lyse der Erythrocyten und anschließende Antikörper-Markierung ermittelt. Die konkurrierende CellSearch®-Methode reichert einerseits die zirkulierenden Tumorzellen im Vorfeld der Messung immunomagnetisch an und verwendet andererseits im Rahmen der Probenaufbereitung eine spezielle Fixierungslösung. Durch diese Art der Zellpräparation gehen viele vitale Zellen verloren oder werden zerstört (Fleisher et al. 2001; Pachmann et al. 2011b). Es entsteht Zelldetritus (Coumans et al. 2010). Dies führt dazu, dass die MAINTRAC®-Methode im Vergleich zum CellSearch®-Verfahren 10-20fach höhere Zellzahlen zirkulierender Tumorzellen detektiert (Pachmann et al. 2011b). Mit der CellSearch®-Methode lässt sich >1 lebensfähige Zelle bei ca. 10% der Patientinnen mit primärem Mammakarzinom (Bidard et al. 2010; Pachmann et al. 2011a) und bei 3% der gesunden Normalbevölkerung nachweisen (Miller et al., 2010). Im Gegensatz dazu findet die MAINTRAC®-Methode bei 92% der Brustkrebspatientinnen und bei 3% der gesunden Normalbevölkerung zirkulierende epitheliale Tumorzellen (Pachmann et al. 2005b).

Für die MAINTRAC®-Methode wird allerdings eine, im Vergleich zum CellSearch®-Verfahren, geringere Spezifität behauptet (Mostert et al. 2009). Dies basiert unter anderem auf der Verwendung von EpCAM als alleinigem Marker für die zirkulierenden epithelialen Tumorzellen bei der Scan[^]R-Messung. Wie bereits erläutert, besteht eine große Heterogenität hinsichtlich der Expression bestimmter Tumorzellmarker (Mostert et al. 2009) sodass ein ultimativer CTC-spezifischer Marker derzeit nicht bekannt ist (Mostert et al. 2009; Paterlini-Brechot & Benali 2007).

EpCAM gilt derzeit als spezifischster Marker zirkulierender epithelialer Tumorzellen (Mostert et al. 2009). Pachmann et al. konnten in einer vergleichenden Studie 2011 nachweisen, dass das EpCAM-Antigen an den detektierten CTCs der CellSearch®-Methode weitaus weniger nachweisbar war als bei der MAINTRAC®-Methode. Es ist davon auszugehen, dass durch den

Anreicherungs-schritt ein Verlust des Oberflächen-Antigens EpCAM zu verzeichnen ist (Pachmann et al. 2011a). Zusätzlich zu dieser Verringerung der EpCAM-Expression, wird während der so genannten epithelial – to – mesenchymal – transition (EMT), die zirkulierende Tumorzellen im Prozess der Metastasierung möglicherweise durchlaufen (Paterlini-Brechot & Benali 2007), ein weiterer Verlust der Oberflächenaktivität von EpCAM beschrieben, welcher auch bei der MAINTRAC®-Methode zu verzeichnen ist. Ein Korrelat dieser Reduktion der EpCAM Expression könnte das so genannte „cap“, das mit der MAINTRAC®-Methode häufig auf zirkulierenden Tumorzellen gefunden wird, sein (Pachmann et al. 2011a). Hierbei zeigen sich die CETCs nicht auf der gesamten Oberfläche als grün-fluoreszierend gefärbt, sondern nur ein kleiner Teil der Zellmembran stellt sich grün-fluoreszierend dar; ähnlich einer Kappe, die von der Zelle getragen wird.

Andere Verfahren, wie beispielsweise die CellSearch®-Methode, nutzen neben EpCAM zusätzlich Cytokeratin-Antikörper (CK-8, -18, -19) zur positiven Detektion und Leukozyten-Antikörper, wie beispielsweise CD-45-Antikörper als Ausschluss (Paterlini-Brechot & Benali 2007). Dadurch kann man zwar den Hauptanteil an Leukozyten, die ebenfalls mit angereichert wurden, ausschließen, doch gehen, wie bereits beschrieben, aufgrund der Anreicherung viele Zellen im Vorfeld verloren (Paterlini-Brechot & Benali 2007). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass zirkulierende Tumorzellen einen Verlust der Cytokeratin-Expression aufweisen können (Paterlini-Brechot & Benali 2007; Willipinski-Stapelfeldt et al. 2005), wodurch eine falsch-negative Reduktion der detektieren Zellzahl zirkulierender Tumorzellen stattfindet. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass auch Leukozyten die Fähigkeit besitzen, Cytokeratine zu exprimieren (Allan & Keeney 2010). Dies bedeutet, dass durch die Markierung mittels CK-Antikörper auch falsch-positive Zellen gefunden werden.

Die MAINTRAC®-Methode nutzt zur Auswertung das halbautomatisierte LSC- bzw. Scan^R-Verfahren. Die beiden Auswertungsverfahren detektieren die EpCAM-positiven Zellen zunächst automatisiert. Anschließend ist bei beiden Verfahren eine Relokalisierung und Nachbeurteilung der gefundenen CETC möglich. Die Nachbeurteilung geschieht nach den definierten Parametern, die bereits im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben wurden. Durch die zellschonendere Aufarbeitung der Zellen nach der MAINTRAC®-Methode

sind die Zellen meist sehr gut erhalten, was die visuelle Beurteilung erheblich erleichtert. Dadurch werden mehr vitale Zellen gefunden als beim CellSearch®-Verfahren.

In der 2011 durchgeführten vergleichenden Studie der beiden Verfahren wurde an Blutproben von 20 Patientinnen nachgewiesen, dass die detektierten Zellzahlen beider Verfahren miteinander korrelieren, wenn die in der CellSearch®-Methode gefundenen Zellpartikel als „Event“ bezeichnet und gezählt werden. Vergleicht man jedoch die gefundenen als Zellen erkennbaren Ereignisse beider Verfahren, so kann die Korrelation nicht mehr bestätigt werden. Es ist allerdings beschrieben, dass es gerade während der Chemotherapie zu einem häufigeren Auftreten dieser Zellpartikel kommt (Pachmann et al. 2011a). Es stellt sich nun die Frage, wie verwertbar die durch die CellSearch®-Methode gefundenen Partikel sind (Coumans et al. 2010).

Des Weiteren ist es durch die Scan[^]R-Methode möglich, Doppelmessungen der Proben durchzuführen, was zu einer Steigerung der Messgenauigkeit führt.

Die bis dato erhobenen Untersuchungen beweisen, dass durch die MAINTRAC®-Methode prognostische Aussagen zu verschiedenen Tumorerkrankungen/Karzinomen anhand zirkulierender epithelialer Zellen getroffen werden können. Beispielsweise konnte beim Mammakarzinom eine Korrelation zwischen dem Therapieansprechen des Primärtumors auf eine adjuvante Chemotherapie und der Kinetik von CETCs anhand der MAINTRAC®-Methode nachgewiesen werden (Pachmann et al. 2008).

Die Vielzahl der vorhandenen Verfahren zeigt, dass die Methoden zur Detektion zirkulierender Tumorzellen noch abgeglichen werden müssen. Dies beinhaltet wohl auch die für epitheliale zirkulierende Tumorzellen optimalsten Marker (Goodale et al. 2009; Mostert et al. 2009). Der klinische Nutzen, den die Untersuchung der zirkulierenden epithelialen Tumorzellen mit sich bringt, ist jedoch bereits in der Gegenwart klar.

6.2 Ergebnisdiskussion

6.2.1 Ergebnisse der Tamoxifengruppe

Dass eine statistisch signifikante Vorhersage bezüglich des Krankheitsverlaufes von Brustkrebs anhand zirkulierender epithelialer Tumorzellen in der Gesamtgruppe nicht möglich war, mag, wie bereits im entsprechenden Kapitel erwähnt, an der Heterogenität der Gruppe liegen. Es handelt sich hierbei um Patientinnen, die entweder eine Tamoxifenmonotherapie erhielten oder einen Therapiewechsel auf einen der drei Aromatasehemmer. Daher wurde die Gruppe im Folgenden aufgeteilt.

Für diejenigen Patientinnen, die eine Tamoxifenmonotherapie erhielten, ergab sich eine statistische Signifikanz ($p=0,05$; Kapitel 5.2.2). Dies bedeutet, dass anhand der Kinetik epithelialer Tumorzellen in dieser Gruppe eine Vorhersage bezüglich des Krankheitsprogresses bzw. eines Rezidivs möglich ist. Hervorzuheben ist hierbei der Betrachtungszeitraum von 10 Jahren und die repräsentative Gruppengröße (welche bei der Betrachtung der anderen Therapieregime nicht erreicht werden konnte). Noch deutlicher wird dies, wenn man die Patientengruppen mit ansteigenden und konstanten Zellverläufen zusammenfasst. Hier erreicht man immerhin ein Signifikanzniveau von $p=0,019$. In den folgenden Betrachtungen wurden diese beiden Verläufe immer wieder zusammengefasst. Dabei kam es häufig zu einer statistischen Signifikanz, was nahe legt, dass die Entscheidung, ob es sich um einen Abfall oder konstanten Zellzahlverlauf handelt, in Folgearbeiten überdacht werden kann.

Wurden aber die Patientinnen, die Tamoxifen vor dem Wechsel auf einen Aromataseinhibitor erhielten, betrachtet, war die Abschätzung eines Tumorprogresses anhand der Zahl zirkulierender Tumorzellen nicht möglich, da sich in diesem Falle keine statistische Signifikanz ergab ($p=0,277$). Betrachtet wurde hier ein Zeitraum von ca. 15 Jahren.

Im Kapitel 5.2.4 wurde untersucht, ob sich eine Signifikanz bei der Berechnung eines anderen Betrachtungszeitraumes ergibt. Es wurde das Zeitintervall von Beginn der Tamoxifentherapie bis zur letzten Messung der epithelialen Tumorzellen berechnet. Hier mussten 3 Patientinnen ausgeschlossen werden, bei denen wir zu wenige Messungen am Ende der Tamoxifentherapie hatten. Zudem haben wir in diesem Falle nur Rezidive auch als

Rezidive gewertet, wenn diese tatsächlich unter Tamoxifen auftraten. Falls die Rezidive später auftraten, so wurde dies als Remission gewertet. Hierunter ergab sich ebenfalls keine statistische Signifikanz ($p=0,874$).

Anschließend wurden die beiden endokrinen Therapieregime, das heißt Tamoxifenmonotherapie und Tamoxifen vor Wechsel auf einen Aromatasehemmer, verglichen (Kapitel 5.2.5). Dies erfolgte, um einen eventuellen Nachteil eines Regimes festzustellen. Dieser konnte allerdings in unserem Patientenkollektiv nicht festgestellt werden ($p=0,711$).

6.2.2 Ergebnisse der Exemestangruppe

Im Folgenden sollen die Ergebnisse in der Exemestangruppe diskutiert werden. In die Gruppe wurden insgesamt 52 Patientinnen eingeschlossen. Einleitend wurde erwähnt, dass Exemestan als irreversibler Aromatasehemmer als potenter gegenüber den anderen Aromataseinhibitoren angesehen wird und daher häufig bei Therapieversagen von Letrozol oder Anastrozol auf Exemestan umgestiegen wird. Daher erfolgte in diesem Abschnitt zusätzlich die Betrachtung der Zellzahlen unter Exemestan nach anderer endokriner Vortherapie (Kapitel 5.2.4). Es zeigte sich jedoch bei dieser sehr heterogenen Gruppe, dass eine Prognoseabschätzung anhand der CETC-Kinetik nicht möglich ist und keine statistische Signifikanz nachgewiesen wurde. Fraglich ist hierbei, ob man die Gruppe auf die jeweiligen Aromatasehemmer hätte aufspalten sollen. In dieser Arbeit wurde aufgrund einer zu kleinen Gruppengröße, die dann entstanden wäre, davon abgesehen.

Bei den Patientinnen, die den steroidal Aromatasehemmer up-front bekamen, war die Zahl der „events“ so klein, dass sich keine Überlebenskurve erstellen ließ. Zukünftige Studien sollten dies nachholen.

Weiterhin erfolgte die Berechnung der Patientinnen-Gruppe, die Exemestan nach Wechsel von Tamoxifen erhielten. Das errechnete Signifikanzniveau von $p=0,093$ zeigt einen Trend hin zu einem besseren rezidivfreien Überleben bei diesen Patientinnen mit abfallenden bzw. konstanten CETC-Zahlen. Hier müssen sicherlich ebenfalls weitere Studien mit größeren Patientenkollektiven folgen.

Im letzten Teil des Kapitels wurden nur die Patientinnen mit Exemestan up-front und Exemestan nach Tamoxifen zusammengefasst. Das Ergebnis zeigte, bei Zusammenfassung der Patientinnen mit abfallenden und konstanten Zellverläufen, einen Trend hin zum besseren Überleben dieser Gruppe ($p=0,067$). Dieser Trend zeichnete sich nach ca. einem Jahr des Betrachtungsintervalls ab

6.2.3 Ergebnisse der Anastrozolgruppe

Hier wurden alle 59 Patientinnen eingeschlossen. Es ergab sich ein Signifikanzniveau von $p=0,071$, was zumindest einen Trend hin zum besseren Überleben derjenigen Patientinnen mit abfallenden und konstanten Zellzahlen erkennen ließ. Auch hier wurde aus der Kaplan – Meier – Kurve eine Abweichung der Kurven nach 5 ½ Jahren deutlich mit einem folgenden Überlebensvorteil der Patientinnen mit abfallenden gegenüber denjenigen Patientinnen mit ansteigenden Zellzahlen unter der Anastrozoltherapie.

In der Gruppe „Anastrozol up front“ konnte kein statistisch signifikantes Ergebnis gezeigt werden ($p=0,214$). Jedoch konnte anhand der Kaplan – Meier – Kurve für rezidivfreies Überleben ein Auseinanderweichen der Kurven ab dem 1500sten Tag gezeigt werden, was für einen leichten Überlebensvorteil derjenigen Patientinnen spricht, die abfallende bzw. konstante Zellzahlen aufwiesen.

Schlussendlich wurden noch Patientinnen mit Anastrozol nach Umstieg von Tamoxifen beleuchtet. Hier ließ sich ebenfalls ein Trend abzeichnen, dass eine Prognoseabschätzung anhand der Zellkinetik zirkulierender epithelialer Tumorzellen möglich ist ($p=0,089$).

6.2.4 Ergebnisse der Letrozolgruppe

Die gefundenen Ergebnisse dieser Gruppe weichen von den anderen Aromatasehemmern insofern ab, dass hier statistisch signifikante Ergebnisse errechnet wurden. Bei der Betrachtung des Gesamtpatientenkollektivs erhielt man eine Signifikanz von $p=0,01$. Danach konnte gezeigt werden, dass Patientinnen mit konstanten oder abfallenden CETC-Zahlen ein längeres rezidivfreies Überleben hatten. Die vorhandene Gruppengröße ist sicherlich nicht repräsentativ und sollte in der Zukunft erweitert werden, es bestätigt die Aussagekraft der CETC-Zahl jedoch deutlich.

Nicht signifikant war die Betrachtung der Letrozoltherapie up front. Hier ist die Aussagekraft wiederum mit $p=0,134$ statistisch nicht signifikant. Signifikanz wurde wiederum an dem, zugegebenermaßen kleineren, Patientenkollektiv „Letrozol nach Switch von Tamoxifen“ erreicht, bei welcher der CETC-Verlauf ebenfalls statistisch signifikante Aussagen bezüglich der Prognose erlaubt ($p=0,01$).

6.2.5 Ergebnisse der Aromataseinhibitorgruppe

Um die doch sehr kleinen Gruppen etwas zu vergrößern, wurden im letzten Kapitel der Auswertung verschiedene Gruppen kombiniert. Im Kapitel 5.6.3 wurden alle Aromatasehemmer zusammengefasst und diejenigen Patientinnen betrachtet, die diese jeweils up-front bekamen. Es zeichnete sich hier, nach Zusammenfassung der konstanten und abfallenden Zellverläufe, ein Trend hin zum Überlebensvorteil dieser Gruppe ab ($p=0,075$).

6.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, nachzuweisen, dass zirkulierende Tumorzellen eine prognostische Relevanz während der Hormontherapie bei primär nicht metastasierten, hormonrezeptorpositiven Brustkrebspatientinnen haben. Vor allem bei der Mehrzahl der älteren Brustkrebspatientinnen (älter als 50 Jahre) finden sich Mammakarzinome, welche hormonrezeptorpositiv sind und damit auf eine entsprechende Hormontherapie ansprechen würden (Bonneterre 1992; Pachmann et al. 2011a).

Eine solche Therapie mit beispielsweise dem selektiven Östrogen-Rezeptor-Modulator (SERM) Tamoxifen ist langwierig und sollte leitliniengerecht über 5 Jahre erfolgen. Bei den meisten Patientinnen kommt es zu einem Ansprechen auf diese Therapie. Nichts desto trotz spricht ein gewisser Prozentsatz der Frauen nicht auf die Tamoxifentherapie an. Dies kann beispielsweise in einem Enzymdefekt des Tamoxifen-Metabolismus begründet sein (Gaston et al. 2008; Pachmann et al. 2011a). 60% der Patientinnen, die ursprünglich auf eine Tamoxifentherapie ansprachen, entwickeln im Laufe der Zeit eine Resistenz gegen Tamoxifen (Pachmann et al. 2011a). Daran lässt sich nachvollziehen, dass die Entwicklung eines Überwachungsparameters auf das Therapieansprechen der Patientinnen sinnvoll ist. Es

konnte bereits gezeigt werden, dass zirkulierende Tumorzellen als unabhängiger Faktor zur Therapieüberwachung von Brustkrebspatientinnen, die Tamoxifen erhalten, eingesetzt werden kann (Pachmann et al. 2011a).

In der 2011 von Pachmann et al. veröffentlichten Studie wurden die Patientinnen, die eine Tamoxifen-Monotherapie erhielten, über ca. 5 Jahre (1825 Tage) beobachtet. Betrachtet man die im Kapitel 5.2.1 der Arbeit gezeigte Kaplan-Meier-Überlebenskurve aller Patientinnen, die eine Tamoxifen erhielten, so zeigt sich eine Überschneidung der Kurven, die einen Zellzahlenanstieg bzw. -abfall; ab ca. 3000 Tagen (ca. 8 Jahre). Dies führt dazu, dass sich über einen längeren Zeitraum keine Signifikanz ergibt. Dagegen war der Unterschied in der Gruppe von Patientinnen, die Tamoxifen als Monotherapie erhielten, signifikant oder hoch signifikant wenn diese nur bis ca. 10 Jahre nachbeobachtet wurden.

Möglicherweise hat dies damit zu tun, dass die Tamoxifentherapie nach den bisherigen Leitlinien nach 5 Jahren beendet wird. Die letzten, auf dem ASCO 2013 vorgetragenen Daten, bestätigen unsere Ergebnisse, dass es nach Abschluss der Tamoxifentherapie vermehrt zu Rezidiven kommt und es gibt Überlegungen, die Therapie bis zu 10 Jahren oder möglicherweise Lebenslang zu verlängern (ASCO 2013, Davies et al. 2013, Gray et al. 2013).

Ziel dieser Arbeit war es des Weiteren, die Kinetik der zirkulierenden Tumorzellen unter der Therapie mit Aromatasehemmern zu betrachten. Bereits veröffentlichte Daten zeigen, dass ein Anstieg der zirkulierenden Tumorzellen während der Tamoxifentherapie auch mit einem früheren Rezidiv bzw. Progress der Erkrankung nach dem switch auf einen Aromatasehemmer einher geht (Pachmann et al. 2011a). Bisher gab es allerdings noch keine Veröffentlichung zum tatsächlichen Verhalten zirkulierender epithelialer Tumorzellen unter der Therapie mit Aromataseinhibitoren. Die vorliegende Arbeit zeigt die Ergebnisse aus bis zu 20 Jahren Überwachungszeitraum. Um ein möglichst großes Patientenkollektiv einzubeziehen, wurden unter anderem die Verläufe der zirkulierenden Tumorzellen bei allen Patientinnen mit Therapie eines Aromatasehemmers betrachtet. Dies betraf, wie aus Kapitel 5.6.3 ersichtlich, 62 Patientinnen. Es zeichnete sich hier der Trend ab, dass eine Prognoseabschätzung anhand der CETC-Verläufe auch über einen längeren Zeitraum hinaus möglich ist (Signifikanzniveau $p=0,075$ bei Zusammenfassung der abfallenden und konstanten Zellzahlen). Allerdings sollte dies anhand eines größeren Patientenkollektivs bestätigt werden.

Bei der Betrachtung der einzelnen Aromataseinhibitoren für sich, kann lediglich in der Letrozol-Gruppe eine Signifikanz ermittelt werden. Es zeigt sich, dass bei den 14 in die Gruppe eingeschlossenen Patientinnen, eine Prognoseabschätzung anhand der Kinetik der zirkulierenden epithelialen Tumorzellen nach Therapie mit Tamoxifen möglich ist (Signifikanzniveau $p=0,002$). Daher stellt sich die Frage, ob die zirkulierenden Tumorzellen nun abhängig vom einzelnen Medikament zu betrachten sind (also nur bei bestimmten Aromatasehemmern eine prognostische Aussagekraft haben), oder ob die gewählten Gruppen für die Betrachtung zu klein waren. Die mittlere Gruppengröße lag bei 20 Patientinnen pro Gruppe (siehe dazu auch Abb. 2 aus Kapitel 4.1. Patientenkollektiv). Dementsprechend war die Gruppengröße der Patientinnen, die Letrozol nach Tamoxifen erhielten, eine der kleinsten Gruppen im betrachteten Patientenkollektiv. Allerdings gab es neben dieser kleinen Gruppe eine weitere Gruppe, die ebenfalls 14 Patientinnen beinhaltete, bei der keine signifikanten Erkenntnisse erlangt werden konnten. Nichts desto trotz steht es außer Frage, dass sich in zukünftigen Studien die Gruppengrößen deutlich vergrößern sollten, um aussagekräftigere Ergebnisse erbringen zu können.

Die anderen Kaplan – Meier - Kurven zum rezidivfreien Überleben, die die Kinetik der zirkulierenden Tumorzellen unter dem jeweiligen Aromatasehemmer darstellen, ergaben zu Beginn der Kurven meist eine bessere Prognose der Patientinnen, die unter dem jeweiligen Aromatasehemmer einen Abfall oder konstanten Verlauf der Zellzahlen haben (z.B. Kaplan-Meier-Überlebenskurven bei der Betrachtung von Exemestan). Es wurde demzufolge gezeigt, dass in den bisherigen relativ kleinen Patientenkollektiven anhand der zirkulierenden Tumorzellen noch keine statistisch signifikanten Aussagen zum Langzeitüberleben der Brustkrebspatientinnen mit Hormontherapie über 10 Jahre hinaus möglich sind. Da auch eine Therapie mit Aromataseinhibitoren nur zwischen 5 und möglicherweise bis zu 10 Jahren umfasst, sind kurzfristigere Aussagen zum Therapieerfolg möglich.

Die erhobenen Erkenntnisse sollten Bestand weiterer Studien sein, welche größere Patientenkollektive einschließen.

Vergleichende Studien, die das Verhalten zirkulierender Tumorzellen unter der Therapie mit Aromatasehemmern betrachten, sind nach unserer Kenntnis nicht vorhanden. Die Studie von Pachmann et al. 2011, die das Verhalten zirkulierender Tumorzellen während der Tamoxifenmonotherapie vorstellt, wurde oben bereits ausführlich beschrieben. Xenedis et

al. veröffentlichten 2007 eine Arbeit, bei der ebenfalls das Verhalten zirkulierender Tumorzellen unter der Tamoxifentherapie betrachtet wurden. Hier wurden die zirkulierenden Tumorzellen allerdings nicht mittels der von uns verwendeten MAINTRAC® - Methode untersucht, sondern mittels reverser Transkription von CK-19 mRNA aus Ficoll-separierten Zellen gefunden. Wie bereits im Kapitel 6.1 erwähnt, werden ähnlich wie mittels CellSearch®-Methode, allerdings weitaus weniger Zellen gefunden (wobei in der Arbeit von Xenidis et al. die CK-19 mRNA-positiven Zellen als „event“ gewertet wurden). Diese Arbeit versuchte zu zeigen, dass zirkulierende Tumorzellen während der adjuvanten Tamoxifentherapie als unabhängiger Faktor für eine schlechte Prognose bei Brustkrebspatientinnen gelten (Xenidis et al. 2007).

Eine Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen wissenschaftlichen Kontext ist daher kaum möglich, da es bisher kaum Studien zum Verhalten zirkulierender Tumorzellen unter endokriner Therapie gibt. Wie gezeigt, stammen meisten Daten stammen aus der Arbeitsgruppe von Pachmann et al..

Zusammenfassend konnte in der Arbeit zumindest in allen Gruppen ein Trend hin zum besseren Überleben derjenigen Patientinnen, die einen Abfall bzw. konstanten Verlauf der CETC-Zahlen hatten, gezeigt werden. In der Letrozol-Gruppe war dies statistisch signifikant.

7 Ausblick

Wie bereits mehrfach erwähnt, müssen die in der Arbeit gefundenen Ergebnisse in der Zukunft anhand größerer Patientenkollektive überprüft werden. Der Nutzen der Bestimmung zirkulierender Tumorzellen ist in der Vergangenheit schon mehrfach bestätigt worden. Aber auch neuere Studien eröffnen anhand der CETCs immer mehr Perspektiven in der onkologischen Therapie. Beispielsweise konnten Pizon et al 2013 die Transformation epithelialer Tumorzellen in Tumorsphären, welche Metastasenstufen darstellen, nachweisen. Mit dieser Arbeit wurde erstmals bewiesen, dass zumindest eine Untergruppe der CETCs Tumorabkömmlinge sind und wahrscheinlich für die Entwicklung von Metastasen verantwortlich sind. Die Zahl der zirkulierenden Tumorzellen wurden mittels MAINTRAC®-Methode bestimmt, da diese Methode zellschonender ist und die tumorsuspekten Zellen während der verschiedenen Krankheitsphasen angereichert und beobachtet werden können (Pizon et al. 2013). Es war zu beobachten, dass EpCAM-positive Zellen präoperativ nur sehr gering transkriptionell aktiv waren. Postoperativ waren bei den gleichen Patientinnen wesentlich mehr und stärkere Signale zu beobachten. Weiterhin zeigten sich verschiedene Genaktivierungen, welche in Zusammenhang mit der mesenchymal – to – epithelial – transition (EMT) stehen (Pizon et al. 2013). Diese Arbeit zeigt die verschiedenen Möglichkeiten, die die Bestimmung zirkulierender Tumorzellen bietet. Wenn die Therapie auf solche Zellen abgestimmt wird, könnte der Durchbruch hin zur frühzeitigen Metastasentherapie gelingen.

Aktueller sind die individualisierten Therapieoptionen, welche anhand dieser Methode möglich sind. Es wurden schon vielfach die Nebenwirkungen der verschiedenen Medikamente und mit diesen auch die sinkende Compliance der Patientinnen angesprochen. Es ist, wie unter anderem auch diese Arbeit beweist, möglich, Patientinnen dies bei Nichtansprechen der Therapie, frühzeitig zu ersparen.

Aus Therapiestudien werden viele Aspekte der Biologie von Mammakarzinomen erst nach vielen Jahren offenbar. Beispielsweise konnte 2013 auch von der ASCO bestätigt werden, dass es nach Absetzen der endokrinen Therapie bei Brustkrebspatientinnen, häufig zu Rezidiven kommt. Möglicherweise hängt dies mit einem Anstieg der zirkulierenden Tumorzellen nach Absetzen der Hormontherapie zusammen (unveröffentlichte Daten). Daher steht jetzt die Frage im Raum, ob die endokrine Therapie prolongiert eingesetzt

werden sollte; es wird sogar über eine lebenslange Einnahme diskutiert. Man sollte in Betracht ziehen, dass in dieser Diskussion die zirkulierenden Tumorzellen als unabhängigen Marker bei der Therapieüberwachung eine ausschlaggebende Rolle spielen könnten.

8 Schlussfolgerung

Ziel der Arbeit war es, das Verhalten zirkulierender Tumorzellen bei primär nicht metastasierten Brustkrebspatientinnen unter der endokrinen Therapie mit dem selektiven Östrogen – Rezeptor – Modulator Tamoxifen und unter den gängigen Aromatasehemmern Exemestan, Anastrozol und Letrozol, zu untersuchen. Die Bestimmung und Analyse der zirkulierenden Tumorzellen erfolgte anhand der bereits etablierten MAINTRAC®-Methode. Diese Folgerungen können gezogen werden:

1. Es konnte ein Überlebensvorteil derjenigen Brustkrebspatientinnen nachgewiesen werden, die einen Abfall bzw. konstanten Verlauf der CETC-Zahlen unter Tamoxifen – Monotherapie hatten.
2. Bei Therapiewechsel von Tamoxifen auf einen Aromatasehemmer konnte in der Exemestan – und Anastrozol – Gruppe ein Trend bezüglich eines Überlebensvorteils bei Brustkrebspatientinnen mit abfallenden bzw. konstanten Zellzahlen gezeigt werden. Einen statistisch signifikanten Überlebensvorteil haben Patientinnen mit abfallenden CETC-Zahlen, welche einen Therapiewechsel zu Letrozol bekamen.
3. In der Gruppe der Patientinnen, die zuerst den Aromatasehemmer erhielten, konnte gezeigt werden, dass im gezeigten Patientenkollektiv die Kinetik zirkulierender Tumorzellen keine prognostische Relevanz hat.
4. Beim Vergleich der verschiedenen Therapieregime konnte gezeigt werden, dass die Tamoxifenmonotherapie in unserem Patientenkollektiv als gleichwertig mit der Switchtherapie zu einem Aromatasehemmer zu werten ist.

Die Arbeit konnte die unbestrittene Relevanz zirkulierender Tumorzellen bei der Therapie des Mammakarzinoms unterstreichen. Gerade der lange Überwachungszeitraum ist eine hervorzuhebende Stärke dieser Arbeit. Die Größe der betrachteten Patientenkollektive sollte in künftigen Arbeiten vergrößert werden, um eindeutigere Ergebnisse zu erlangen.

9 Literaturverzeichnis

Allan AL, Keeney M. Circulating tumor cell analysis: technical and statistical considerations for application to the clinic. *J Oncol* 2010; 2010:426218.

Allard WJ, Matera J, Miller MC et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 2004; 10:6897-904.

Aplin AE, Howe A, Alahari SK et al. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 1998; 50:197-263.

Apostolaki S, Perraki M, Pallis A et al. Circulating HER2 mRNA-positive cells in the peripheral blood of patients with stage I and II breast cancer after the administration of adjuvant chemotherapy: evaluation of their clinical relevance. *Ann Oncol* 2007; 18:851-8.

Arpino G, Weiss H, Lee AV et al. Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97:1254-61.

American Society Clinical of Oncology (ASCO); June 4, 2013; Extending Adjuvant Tamoxifen Reduces Breast Cancer Recurrence, Mortality; [Datenlieferung: November2013, Aufruf am 23.11.2013] URL: <http://am.asco.org/extending-adjuvant-tamoxifen-reduces-breast-cancer-recurrence-mortality>.

Baeuerle PA, Gires O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer* 2007; 96:417-23.

Balzar M, Prins FA, Bakker HA et al. The structural analysis of adhesions mediated by Ep-CAM. *Exp Cell Res* 1999a; 246:108-21.

Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ et al. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med (Berl)* 1999b; 77:699-712.

Baum M, Hackshaw A, Houghton J et al. Adjuvant goserelin in pre-menopausal patients with early breast cancer: Results from the ZIPP study. *Eur J Cancer* 2006; 42:895-904.

Berois N, Varangot M, Aizen B et al. Molecular detection of cancer cells in bone marrow and peripheral blood of patients with operable breast cancer. Comparison of CK19, MUC1 and CEA using RT-PCR. *Eur J Cancer* 2000; 36:717-23.

Bidard FC, Mathiot C, Delaloge S et al. Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2010; 21:729-33.

BLOOM HJ, RICHARDSON WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 1957; 11:359-77.

Bodmer A, Castiglione M. Mammakarzinom im Frühstadium: St. Gallen Konsensus 2011 - Neue Erkenntnisse und Kontroversen in der Behandlung. In: Schweizer Zeitschrift für Onkologie; 2011: 17-21.

Bonneterre J. [Meta-analysis of adjuvant medical treatment in breast cancers. Ten year results]. Bull Cancer 1992; 79:459-64.

Bossolasco P, Ricci C, Farina G et al. Detection of micrometastatic cells in breast cancer by RT-pCR for the mammaglobin gene. Cancer Detect Prev 2002; 26:60-3.

Braun S, Naume B. Circulating and disseminated tumor cells. J Clin Oncol 2005; 23:1623-6.

Böcker W, Decker T. Pathologie des invasiven Mammakarzinoms. Der Onkologe, Springer-Verlag 2008a; 14:pp 443-53.

Böcker W, Decker T. Pathologie des invasiven Mammakarzinoms. 2008b.

Bühling KJ, Lepenies J, Witt K. Intensivkurs Allgemeine und Spezielle Pathologie. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München; 2004.

Carstens PH, Greenberg RA, Francis D et al. Tubular carcinoma of the breast. A long term follow-up. Histopathology 1985; 9:271-80.

Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. Cancer 1989; 63:181-7.

Chlebowski RT. Pre-empting breast cancer: where do we go from here? Womens Health (Lond Engl) 2008; 4:113-4.

Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. Oncologist 2004; 9:606-16.

Clark GM, McGuire WL. Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer. Semin Oncol 1988; 15:20-5.

Coumans FA, Doggen CJ, Attard G et al. All circulating EpCAM+CK+CD45- objects predict overall survival in castration-resistant prostate cancer. Ann Oncol 2010; 21:1851-7.

Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. N Engl J Med 2004; 351:781-91.

Crohns C, Bauerschlag D, Maas N. Endokrine Therapie des Mammakarzinoms - Neue Entwicklungen. Der Gynäkologe 3 2009; 42:164–9.

Davies C, Pan H, Godwin J, et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. Lancet 2013; 381: 805–16.

de Boer CJ, van Krieken JH, Janssen-van Rhijn CM et al. Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *J Pathol* 1999; 188:201-6.

Dowsett M. Origin and characteristics of adverse events in aromatase inhibition therapy for breast cancer. *Semin Oncol* 2003; 30:58-69.

EBCTCG. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 365:1687-717.

Ensinger C, Kremser R, Prommegger R et al. EpCAM overexpression in thyroid carcinomas: a histopathological study of 121 cases. *J Immunother* 2006; 29:569-73.

Ferlay J, Shin HR, Bray F et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127:2893-917.

Fisher B, Bauer M, Wickerham DL et al. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer* 1983; 52:1551-7.

Fleisher TA, Marti GE. Detection of unseparated human lymphocytes by flow cytometry. *Curr Protoc Immunol* 2001; Chapter 7:Unit 7.9.

Gagliardi A, Collins DC. Inhibition of angiogenesis by antiestrogens. *Cancer Res* 1993; 53:533-5.

Gaston C, Kolesar J. Clinical significance of CYP2D6 polymorphisms and tamoxifen in women with breast cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 2008; 6:825-33.

Gnant M, Mlineritsch B, Schippinger W et al. Endocrine therapy plus zoledronic acid in premenopausal breast cancer. *N Engl J Med* 2009; 360:679-91.

Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol* 2009; 20:1319-29.

Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 2011; 22:1736-47.

Goodale D, Phay C, Brown W et al. Flow cytometric assessment of monocyte activation markers and circulating endothelial cells in patients with localized or metastatic breast cancer. *Cytometry B Clin Cytom* 2009; 76:107-17.

Goss PE, Ingle JN, Martino S et al. A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N Engl J Med* 2003; 349:1793-802.

Gray R G, Rea D, Handley K, et al. ASCO Annual Meeting Abstracts: aTTom: Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years in 6,953 women with early breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2013; Vol 31, No 18_suppl (June 20 Supplement), 2013: 5.

Herlyn M, Steplewski Z, Herlyn D et al. Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76:1438-42.

Hilsenbeck SG, Ravdin PM, de Moor CA et al. Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52:227-37.

Horwitz AF, Hunter T. Cell adhesion: integrating circuitry. *Trends Cell Biol* 1996; 6:460-1.
Jacob K, Sollier C, Jabado N. Circulating tumor cells: detection, molecular profiling and future prospects. *Expert Rev Proteomics* 2007; 4:741-56.

Janni W. Manual Mammakarzinome- Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. In: Tumorzentrum München. München, Wien, New York: W. Zuckschwerdt Verlag GmbH; 2007.

Karow T, Lang-Roth R. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 2011.
Klatte T, Pantuck AJ, Said JW et al. Cytogenetic and molecular tumor profiling for type 1 and type 2 papillary renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009; 15:1162-9.

Koscielny S, Tubiana M, Lê MG et al. Breast cancer: relationship between the size of the primary tumour and the probability of metastatic dissemination. *Br J Cancer* 1984; 49:709-15.

Kreienberg R, Albert U-S, Follmann M et al. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. In: Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, der Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V.; 2012.

Kreienberg R, Möbus V, Jonat W et al. Mammakarzinom interdisziplinär. Springer Berlin Heidelberg; 2010.

Linnenbach AJ, Seng BA, Wu S et al. Retroposition in a family of carcinoma-associated antigen genes. *Mol Cell Biol* 1993; 13:1507-15.

Litvinov SV, Bakker HA, Gourevitch MM et al. Evidence for a role of the epithelial glycoprotein 40 (Ep-CAM) in epithelial cell-cell adhesion. *Cell Adhes Commun* 1994a; 2:417-28.

Litvinov SV, Velders MP, Bakker HA et al. Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 1994b; 125:437-46.

Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 1998; 153:865-73.

Lüllmann H, Mohr K, Hein L. Pharmakologie und Toxikologie. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart; 2006.

Maetzel D, Denzel S, Mack B et al. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol* 2009; 11:162-71.

Mavroudis D. Circulating cancer cells. *Ann Oncol* 2010; 21 Suppl 7:vii95-100.

Momburg F, Moldenhauer G, Hämmerling GJ et al. Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. *Cancer Res* 1987; 47:2883-91.

Mostert B, Sleijfer S, Foekens JA et al. Circulating tumor cells (CTCs): detection methods and their clinical relevance in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2009; 35:463-74.

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK et al. Mutschler Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart; 2001.

Nemoto T, Natarajan N, Bedwani R et al. Breast cancer in the medial half. Results of 1978 National Survey of the American College of Surgeons. *Cancer* 1983; 51:1333-8.

Neville AM, Bettelheim R, Gelber RD et al. Factors predicting treatment responsiveness and prognosis in node-negative breast cancer. The International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1992; 10:696-705.

Okegawa T, Pong RC, Li Y et al. The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. *Acta Biochim Pol* 2004; 51:445-57.

Pachmann K, Camara O, Kavallaris A et al. Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse. *J Clin Oncol* 2008; 26:1208-15.

Pachmann K, Camara O, Kavallaris A et al. Quantification of the response of circulating epithelial cells to neoadjuvant treatment for breast cancer: a new tool for therapy monitoring. *Breast Cancer Res* 2005a; 7:R975-9.

Pachmann K, Camara O, Kohlhasse A et al. Assessing the efficacy of targeted therapy using circulating epithelial tumor cells (CETC): the example of SERM therapy monitoring as a unique tool to individualize therapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011a; 137:821-8.

Pachmann K, Clement JH, Schneider CP et al. Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer. *Clin Chem Lab Med* 2005b; 43:617-27.

Pachmann UA, Hekimian K, Carl S et al. Comparing Sequential Steps For Detection Of Circulating Tumor Cells: More Specific Or Just Less Sensitive? In. *WebmedCentral CANCER* 2011;2(2):WMC001490; 2011b.

Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett* 2007; 253:180-204.

Patriarca C, Macchi RM, Marschner AK et al. Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review. *Cancer Treat Rev* 2012; 38:68-75.

Pinzani P, Salvadori B, Simi L et al. Isolation by size of epithelial tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation with real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction results and feasibility of molecular analysis by laser microdissection. *Hum Pathol* 2006; 37:711-8.

Pizon M, Zimon D, Carl S et al. Heterogeneity of circulating epithelial tumour cells from individual patients with respect to expression profiles and clonal growth (sphere formation) in breast cancer. *Ecancermedalscience* 2013; 7:343.

Preiß J, Dornoff W, Hagmann F-G et al. Taschenbuch Onkologie – Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie. Germering/München: W. Zuckschwerdt Verlag GmbH; 2012.

Ralhan R, Cao J, Lim T et al. EpCAM nuclear localization identifies aggressive thyroid cancer and is a marker for poor prognosis. *BMC Cancer* 2010; 10:331.

Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe* 1987; 8:138-40.

Ridolfi RL, Rosen PP, Port A et al. Medullary carcinoma of the breast: a clinicopathologic study with 10 year follow-up. *Cancer* 1977; 40:1365-85.

Riethdorf S, Fritsche H, Müller V et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res* 2007; 13:920-8.

Ring AE, Zabaglo L, Ormerod MG et al. Detection of circulating epithelial cells in the blood of patients with breast cancer: comparison of three techniques. *Br J Cancer* 2005; 92:906-12.

RKI. Krebs in Deutschland 2007/2008. In: Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.; 2012: 64-7.

Rosen PP, Groshen S, Kinne DW et al. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 1993; 11:2090-100.

Rosen PP, Groshen S, Saigo PE et al. Pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. *J Clin Oncol* 1989; 7:1239-51.

- Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM et al. Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques. *Blood* 1993; 82:2605-10.
- Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF et al. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist* 2009; 14:320-68.
- Saez RA, McGuire WL, Clark GM. Prognostic factors in breast cancer. *Semin Surg Oncol* 1989; 5:102-10.
- Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L et al. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 1984; 312:513-6.
- Scheunemann P, Stoecklein NH, Rehders A et al. Occult tumor cells in lymph nodes as a predictor for tumor relapse in pancreatic adenocarcinoma. *Langenbecks Arch Surg* 2008; 393:359-65.
- Schmidt M, Hasenclever D, Schaeffer M et al. Prognostic effect of epithelial cell adhesion molecule overexpression in untreated node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14:5849-55.
- Schneider BP, Miller KD. Angiogenesis of breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23:1782-90.
- Schoenfeld A, Kruger KH, Gomm J et al. The detection of micrometastases in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer using immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction for keratin 19. *Eur J Cancer* 1997; 33:854-61.
- Seligson DB, Pantuck AJ, Liu X et al. Epithelial cell adhesion molecule (KSA) expression: pathobiology and its role as an independent predictor of survival in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10:2659-69.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235:177-82.
- Sleijfer S, Gratama JW, Sieuwerts AM et al. Circulating tumour cell detection on its way to routine diagnostic implementation? *Eur J Cancer* 2007; 43:2645-50.
- Smith BM, Slade MJ, English J et al. Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. *J Clin Oncol* 2000; 18:1432-9.
- Spizzo G, Went P, Dirnhofer S et al. High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 86:207-13.
- Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D et al. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol* 2002; 20:3404-12.

Tandon AK, Clark GM, Chamness GC et al. Association of the 323/A3 surface glycoprotein with tumor characteristics and behavior in human breast cancer. *Cancer Res* 1990; 50:3317-21.

Trzpis M, McLaughlin PM, de Leij LM et al. Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J Pathol* 2007; 171:386-95.

van der Gun BT, Melchers LJ, Ruiters MH et al. EpCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly. *Carcinogenesis* 2010; 31:1913-21.

Williams MR, Todd JH, Ellis IO et al. Oestrogen receptors in primary and advanced breast cancer: an eight year review of 704 cases. *Br J Cancer* 1987; 55:67-73.

Willipinski-Stapelfeldt B, Riethdorf S, Assmann V et al. Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11:8006-14.

Winter MJ, Nagelkerken B, Mertens AE et al. Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Exp Cell Res* 2003; 285:50-8.

Wong NS, Kahn HJ, Zhang L et al. Prognostic significance of circulating tumour cells enumerated after filtration enrichment in early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 99:63-9.

Wörmann B, Overkamp F, Rick O et al. Mammakarzinom der Frau – Leitlinie. In: Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie e.V. (DGHO); 2011.

Xenidis N, Markos V, Apostolaki S et al. Clinical relevance of circulating CK-19 mRNA-positive cells detected during the adjuvant tamoxifen treatment in patients with early breast cancer. *Ann Oncol* 2007; 18:1623-31.

10 Anhang

10.1 Lebenslauf

Name: Susanne Edler

Geburtsdatum: 10. Februar 1985

Geburtsort: Wurzen

Familienstand: verheiratet

Schulischer Werdegang:

| | |
|-----------------|--|
| 07/1991-06/1996 | Grundschule Schöna |
| 07/1996-05/2004 | Karl – August – Möbius Gymnasium, Eilenburg |
| 07/2001-05/2002 | Auslandsaufenthalt in den USA im Rahmen eines Schüleraustauschprogrammes |
| 07/2004 | Abitur am Karl – August – Möbius Gymnasium, Eilenburg |

Studium:

| | |
|-----------------|---|
| 07/2004-12/2011 | Studium der Humanmedizin an der Friedrich – Schiller – Universität Jena |
| 12/2011 | 2. Staatsexamen |

Beruflicher Werdegang:

| | |
|--------------|---|
| Seit 02/2012 | Assistenzärztin in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie am Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz |
| Seit 09/2013 | Absolvierung der sechsmonatigen Ausbildung auf der anästhesiologischen Intensivstation im Bundeswehrzentral-krankenhaus Koblenz |

10.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau Prof. Dr. K. Pachmann (Klinik für Innere Medizin II) & Dr. Torsten Kroll;

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Koblenz, 10.11.2013

Susanne Edler

10.3 Abbildungsverzeichnis

| | | |
|---------------|--|----|
| Abb. 1: | Algorithmus zur endokrinen Therapie (modifiziert nach Crohns et al. 2009 und DGHO-Leitlinie 2009). | 18 |
| Abb. 2: | Darstellung des Patientenkollektivs und Unterteilung in Untergruppen entsprechend der durchgeführten endokrinen Therapie. | 21 |
| Abb. 3: | Protokoll zur Probenaufbereitung für die Scan^R-Messung. | 26 |
| Abb. 4 (A-G): | (A-F) Darstellung vitaler und avitaler EpCAM-positiver CETC unter dem Scan^R-Mikroskop; (G) schematische Darstellung des MAINTRAC®-Prinzips. | 28 |
| Abb. 5: | Bildschirmausschnitt des Analysis Programms zur Auswertung der CETC mit dem Scan^R-Mikroskop. | 28 |
| Abb. 6 (A-C): | Laser Scanning Cytometrie. | 30 |
| Abb. 7: | Beispiel eines Anstiegs der zirkulierenden epithelialen Tumorzellen. | 33 |
| Abb. 8: | Beispiel eines Abfalls der zirkulierenden epithelialen Tumorzellen. | 33 |
| Abb. 9: | Beispiel eines konstanten Verlaufs der zirkulierenden epithelialen Tumorzellen. | 34 |
| Abb. 10: | Kaplan-Meier-Überlebenskurve des Gesamtpatientenkollektivs Tamoxifen. | 37 |
| Abb. 11: | Kaplan-Meier-Überlebenskurve bei Tamoxifen-Monotherapie. | 39 |
| Abb. 12: | Kaplan-Meier-Überlebenskurve bei Tamoxifen-Monotherapie (Abfall und konstanter CETC-Verlauf zusammen). | 40 |
| Abb. 13: | Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Patientinnen mit Tamoxifen vor switch auf einen Aromatasehemmer. | 42 |
| Abb. 14: | Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Patientinnen mit Tamoxifen vor switch auf einen Aromatasehemmer (Betrachtung des Zeitraumes nur unter Tamoxifen). | 44 |
| Abb. 15: | Kaplan-Meier-Überlebenskurve bei Therapievergleich Tamoxifen-Monotherapie vs. Tamoxifen vor switch. | 46 |
| Abb. 16: | Kaplan-Meier-Überlebenskurve bei Betrachtung des Gesamtpatientenkollektivs unter Exemestan. | 49 |

| | | |
|----------|---|----|
| Abb. 17: | Kaplan-Meier-Überlebenskurve bei Exemestan up-front und nach switch von Tamoxifen. | 51 |
| Abb. 18: | Kaplan-Meier-Überlebenskurve bei Exemestan nach switch von Tamoxifen. | 53 |
| Abb. 19: | Kaplan-Meier-Überlebenskurve bei Betrachtung des Gesamtpatientenkollektives unter Anastrozol. | 57 |
| Abb. 20: | Kaplan-Meier-Überlebenskurve bei Anastrozol up-front. | 59 |
| Abb. 21: | Kaplan-Meier-Überlebenskurve bei Anastrozol nach switch von Tamoxifen. | 61 |
| Abb. 22: | Kaplan-Meier-Überlebenskurve bei Betrachtung des Gesamtpatientenkollektives unter Letrozol. | 64 |
| Abb. 23: | Kaplan-Meier-Überlebenskurve bei Letrozol up-front. | 66 |
| Abb. 24: | Kaplan-Meier-Überlebenskurve bei Letrozol nach switch von Tamoxifen. | 68 |
| Abb. 25: | Kaplan-Meier-Überlebenskurve bei Therapievergleich steroidale vs. nicht-steroidale Aromatasehemmer. | 70 |
| Abb. 26: | Kaplan-Meier-Überlebenskurve bei reversiblen Aromatasehemmern. | 71 |
| Abb. 27: | Kaplan-Meier-Überlebenskurve bei Betrachtung des Gesamtpatientenkollektives unter Aromatasehemmern. | 73 |

10.4 Tabellenverzeichnis

| | | |
|----------|--|----|
| Tab. 1: | Immunhistochemische Scores zur Hormonrezeptorbestimmung. | 13 |
| Tab. 2: | Chemikalien und Lösungen. | 22 |
| Tab. 3: | Antikörper und Farbstoffe. | 22 |
| Tab. 4: | Verbrauchsmaterialien und Labortechnik. | 23 |
| Tab. 5: | Optische Geräte und zugehörige Software. | 23 |
| Tab. 6: | Gesamtpatientenkollektiv der Tamoxifengruppe. | 35 |
| Tab. 7: | Kreuztabelle Tamoxifen gesamt. | 36 |
| Tab. 8: | Darstellung der Signifikanz unter Tamoxifen. | 36 |
| Tab. 9: | Kreuztabelle Tamoxifen-Monotherapie. | 38 |
| Tab. 10: | Darstellung der Signifikanz unter Tamoxifen-Monotherapie. | 38 |
| Tab. 11: | Darstellung der Signifikanz unter Tamoxifen-Monotherapie (Abfall und konstanter CETC-Verlauf zusammen). | 40 |
| Tab. 12: | Kreuztabelle Tamoxifen vor switch auf Aromatasehemmer. | 41 |
| Tab. 13: | Darstellung der Signifikanz bei Tamoxifen vor switch auf Aromatasehemmer. | 42 |
| Tab. 14: | Kreuztabelle Tamoxifen vor switch auf Aromatasehemmer (Betrachtung des Zeitraumes nur unter Tamoxifen). | 43 |
| Tab. 15: | Darstellung der Signifikanz bei Tamoxifen vor switch auf Aromatasehemmer (Betrachtung des Zeitraumes nur unter Tamoxifen). | 44 |
| Tab. 16: | Kreuztabelle Therapievergleich Tamoxifen-Monotherapie vs. Tamoxifen vor switch. | 45 |
| Tab. 17: | Darstellung der Signifikanz bei Therapievergleich Tamoxifen-Monotherapie vs. Tamoxifen vor switch. | 45 |
| Tab. 18: | Gesamtpatientenkollektiv der Exemestangruppe. | 47 |
| Tab. 19: | Kreuztabelle Gesamtpatientenkollektiv Exemestan. | 48 |
| Tab. 20: | Darstellung der Signifikanz bei Betrachtung des Gesamtpatientenkollektives unter Exemestan. | 48 |

| | | |
|----------|--|----|
| Tab. 21: | Kreuztabelle Exemestan up-front und nach switch von Tamoxifen. | 50 |
| Tab. 22: | Darstellung der Signifikanz bei Exemestan up-front und nach switch von Tamoxifen. | 50 |
| Tab. 23: | Kreuztabelle Exemestan up-front. | 52 |
| Tab. 24: | Kreuztabelle Exemestan nach switch von Tamoxifen. | 53 |
| Tab. 25: | Darstellung der Signifikanz bei Exemestan nach switch von Tamoxifen. | 53 |
| Tab. 26: | Gesamtpatientenkollektiv der Anastrozolgruppe. | 55 |
| Tab. 27: | Kreuztabelle Gesamtpatientenkollektiv Anastrozol. | 56 |
| Tab. 28: | Darstellung der Signifikanz bei Betrachtung des Gesamtpatientenkollektives unter Anastrozol. | 56 |
| Tab. 29: | Kreuztabelle Anastrozol up-front. | 58 |
| Tab. 30: | Darstellung der Signifikanz bei Anastrozol up-front. | 58 |
| Tab. 31: | Kreuztabelle Anastrozol nach switch von Tamoxifen. | 60 |
| Tab. 32: | Darstellung der Signifikanz bei Anastrozol nach switch von Tamoxifen. | 60 |
| Tab. 33: | Gesamtpatientenkollektiv der Letrozolgruppe. | 62 |
| Tab. 34: | Kreuztabelle Gesamtpatientenkollektiv Letrozol. | 63 |
| Tab. 35: | Darstellung der Signifikanz bei Betrachtung des Gesamtpatientenkollektives unter Letrozol. | 63 |
| Tab. 36: | Kreuztabelle Letrozol up-front. | 65 |
| Tab. 37: | Darstellung der Signifikanz bei Letrozol up-front. | 65 |
| Tab. 38: | Kreuztabelle Letrozol nach switch von Tamoxifen. | 67 |
| Tab. 39: | Darstellung der Signifikanz bei Letrozol nach switch von Tamoxifen. | 67 |
| Tab. 40: | Kreuztabelle Therapievergleich steroidale vs. nicht-steroidale Aromatasehemmer. | 69 |
| Tab. 41: | Darstellung der Signifikanz bei Therapievergleich steroidale vs. nicht-steroidale Aromatasehemmer. | 69 |
| Tab. 42: | Kreuztabelle reversible Aromatasehemmer. | 71 |
| Tab. 43: | Darstellung der Signifikanz bei reversiblen Aromatasehemmern. | 71 |

| | | |
|----------|--|----|
| Tab. 44: | Kreuztabelle Gesamtpatientenkollektiv Aromatasehemmer. | 72 |
| Tab. 45: | Darstellung der Signifikanz bei Betrachtung des Gesamtpatientenkollektives unter Aromatasehemmern. | 72 |

10.5 Danksagung

Ich möchte mich recht herzlich bei Frau Prof. Dr. Pachmann für die Möglichkeit der Durchführung der Promotion bedanken. Vielen Dank für den unermüdlichen Einsatz und die wunderbare Betreuung während der gesamten Zeit!

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Torsten Kroll bedanken, der vor allem in technischen Fragen immer helfend zur Seite stand.

Auch gilt mein Dank der Arbeitsgruppe des onkologischen Forschungslabors, insbesondere Frau Cornelia Jörke, die mich in die labortechnische Arbeit eingewiesen haben und alle Fragen mit Geduld beantwortet haben.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meinem Ehemann Benjamin, ohne dessen Hilfe diese Arbeit nie gelungen wäre. Danke, dass du mir immer wieder seelischen und moralischen Beistand geleistet hast und mich immer wieder motivieren konntest!

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie sowie den Familien Müller-Taubald und Wolf, die mir mit ihrer bedingungslosen Unterstützung während meiner Ausbildung viele Möglichkeiten eröffnet haben, nicht zuletzt das Zustandekommen dieser Arbeit.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei meinen Freunden und Kollegen, besonders Brenda Henning, Peter Kreisel, Stefanie Rückwart und Nadine Richter sowie Laura Jung, Tim Trotzke und Dan Bieler die mich im Privaten unterstützt haben, viel Verständnis zeigten und mit anregenden Ideen und Gesprächen zur Seite standen.